N° d'ordre :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Claude MATHIS
Chef de Travaux à la Faculté
de Pharmacie de Strasbourg

PREMIÈRE THESE

ETUDE CHIMIO-TAXONOMIQUE DU GENRE HYPERICUM L.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le octobre 1963 devant la Commission d'Examen :

Mlle A. GAGNIEU . . . . . Président
MM. P. DUQUÉNOIS Examinateurs
G. OURISSON

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0023

N° d'ordre :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Claude MATHIS
Chef de Travaux à la Faculté
de Pharmacie de Strasbourg

PREMIÈRE THESE

ETUDE CHIMIO-TAXONOMIQUE DU GENRE HYPERICUM L.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le octobre 1963 devant la Commission d'Examen :

Mlle A. GAGNIEU . . . . . Président
MM. P. DUQUÉNOIS Examinateurs
G. OURISSON

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES
DE
L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen : Professeur G. MILLOT

Doyens honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE

Professeurs honoraires : Ed. BAUER, P. de BEAUCHAMP, R. BONNET, L. BOUNOURE, H. CARTAN, G. CERF, Cl. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, L. HACKSPILL, A. HEE, R. ROCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, H. OLLIVIER, G. RIBAUD, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, Et. WOLFF, J. YVON.

Professeurs :

H. WEISS	T.	Physicochimie des Hydrocarbures
G. HUGEL	T.	Chimie du Pétrole
H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
L. BOISSELET	T.	Chimie analytique du Pétrole
A. MAILLARD	T.T.P.	Chimie
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.T.P.	Mécanique des fluides
J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
Ph. PLUVINAGE	T.	Physique expérimentale
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physique générale
J.L. KOSZUL	T.	Topologie
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle GILLET S.	T.T.P.	Paléontologie
Mlle GAGNIEU A.	T.T.P.	Botanique
R. THOM	T.	Analyse supérieure
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	P.s.C.	Chimie biologique
J. BRENET	T.T.P.	Chimie Physique
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie

Fr. STEPHAN	P.s.C.	Zoologie
Cl. LEVI	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.T.P.	Physique
M. BERGER	T.T.P.	Mathématiques
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONGCHAMP	P.s.C.	Physique
J. BOSCHER	P.s.C.	Mécanique des Fluides
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Physique
R. ARMBRUSTER	P.s.C.	Physique
A. ROCHE	P.s.C.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
J. YOCOOZ	T.	Physique théorique
A. SIGOT	P.s.C.	Zoologie
J. COGNE	P.s.C.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	P.s.C.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique

Maîtres de conférences :

J. PARROD	Chimie
R. WEY	Chimie
J. WUCHER	Physique
Mme D. MAGNAC	Physique
Mme M. BRINI	Chimie
M. DAUNE	Physique
J.P. ADLOFF	Chimie nucléaire
J. GREMILLARD	Mathématiques
G. PERNY	Physique
J. LEVISALLES	Chimie
D. BERNARD	Méthodes Mathématiques de la Physique
R. BARO	Physique
G. LAPRAZ	Botanique
H. DANAN	Physique
M. ZISMAN	Mathématiques
E. DANIEL	Physique
F. NORGUET	Mathématiques
P. CHEVALLIER	Physique
J. LERAY	Physique
H. DURANTON	Botanique
R. WEISS	Chimie
P. CARTIER	Mathématiques
J.P. SCHWING	Chimie
M. SIESKIND	Physique
G. MONSONEGO	Physique mathématique
P. GABRIEL	Mathématiques

Secrétaire : G. SAINT-PE

A Monsieur le Professeur G. OURISSON,

Professeur à la Faculté des Sciences,

à qui je dois le sujet de la thèse et qui n'a cessé de suivre mon travail avec intérêt et bienveillance.

Témoignage de sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. DUQUENOIS,

Doyen Honoraire de la Faculté de Pharmacie,

qui a guidé mes premières recherches, qui m'a conseillé utilement et encouragé tout au long de ce travail.

Hommage de profonde gratitude.

A tous les miens.

A mes amis.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Mademoiselle le Professeur A. GAGNIEU, Membre du Jury, pour ses suggestions intéressantes, relatives à l'hybridation dans le genre *Hypericum*.

Monsieur le Professeur P. JAEGER (Faculté de Pharmacie) pour ses conseils précieux concernant la systématique botanique.

Monsieur le Professeur J. SCHREIBER (Faculté de Pharmacie) pour les analyses élémentaires.

Monsieur le Professeur R. HEGNAUER (Université de Leyde) pour ses remarques très utiles, relatives aux problèmes chimio-taxonomiques.

Messieurs les Professeurs R.I. REED et G. EGLINGTON (Université de Glasgow) pour quelques mesures physiques.

Monsieur le Docteur N.K.B. ROBSON (British Museum, Natural History) pour l'identification de divers échantillons d'herbier et pour ses suggestions concernant la classification du genre *Hypericum*.

Monsieur G. IGOLEN, Directeur des Etablissements Chiris (Grasse), qui a mis un alambic et des produits de référence à notre disposition.

Monsieur R. SIGWALT, Directeur des Raffineries de Normandie, pour des carbures de référence.

Messieurs les Directeurs des Etablissements Givaudan (Genève) et Dérivés Résiniques et Terpéniques (Dax) pour des produits de référence.

Mademoiselle S. CONRATH pour certaines injections de chromatographie gazeuse ; Monsieur F. HEMMERT, Mesdemoiselles H. HERRMANN, E. POUSSE, M. MUNIER qui ont effectué des mesures spectrales (Institut de Chimie).

Monsieur BERNHARDT (Institut de Chimie) pour la réalisation du four à pyrolyse.

Monsieur R. SCHMITT (Jardin Botanique) pour la culture en pots des espèces d'*Hypericum*.

Monsieur M. REUTHER (Faculté de Pharmacie) pour son dévouement constant au laboratoire.

INTRODUCTION

Taxonomie chimique des végétaux

La classification botanique des végétaux est relativement ancienne, puisque c'est dès 1753 que le naturaliste suédois LINNE, dans «*Species Plantarum*», avait réparti les plantes en familles, genres, espèces dont beaucoup sont encore retenus aujourd'hui. Depuis cette date, la classification a été sans cesse révisée et complétée, non seulement grâce aux caractères morphologiques et anatomiques, mais aussi à l'aide des renseignements fournis par la cytologie, la génétique ou l'embryologie.

Les grandes lignes de la classification systématique ainsi établie sont confirmées par un nombre de caractères tel qu'elles ne risquent guère d'être remises en doute. Pour certaines familles botaniques, les subdivisions en genres et même en espèces reposent également sur des bases très solides. Par contre, dans d'autres familles, pourtant bien étudiées, la classification reste sans cesse controversée : soit par suite d'hybridations interspécifiques faciles rendant souvent les caractères anatomo-morphologiques aléatoires, soit par suite des divergences entre la morphologie et la caryologie p.ex. Dans ces cas, il paraît problématique que les sciences utilisées jusqu'ici puissent encore fournir les arguments décisifs nécessaires.

Il était indispensable, par conséquent, de rechercher d'autres critères qui puissent contribuer à élucider les points litigieux ou obscurs de la classification systématique. Depuis longtemps, l'étude de la composition chimique des végétaux avait montré que certains types de substances étaient particuliers à une famille ou à un genre ; les facteurs extérieurs (sol, climat, etc.) n'ont, en général, qu'une influence réduite sur la présence ou l'absence de ces substances. Il était donc permis de penser que la composition chimique, placée avant tout sous la dépendance des facteurs génétiques de la plante, pouvait constituer un critère taxonomique intéressant soit pour délimiter une unité systématique, soit pour mettre en évidence les hybridations.

Les *acides nucléiques* dont les variations de structure confèrent aux gènes leur spécificité, constitueraient évidemment la matière idéale pour une telle étude. Mais dans l'état actuel de nos connaissances chimiques, l'étude de la structure fine des acides nucléiques est encore inabordable et nous devons nous satisfaire de comparer des constituants moins complexes de la plante. Ces composants sont néanmoins des *« reflets »* de la structure des acides nucléiques, puisqu'ils sont soumis au contrôle génétique assuré par ces acides.

Cette nouvelle méthode d'étude de la classification des végétaux, à laquelle on a donné le nom de *chimio-taxonomie*, a pris, ces dernières années, un essor extraordinaire, ceci surtout grâce aux *microméthodes analytiques* récentes : chromatographies sur papier, sur couche mince, en phase gazeuse, électrophorèse, etc. En effet, l'étude chimique complète d'une famille ou même d'un genre pose très souvent de sérieux problèmes de matière première : il est d'abord difficile de posséder en quantité suffisante des échantillons de toutes les espèces à examiner ; il faut s'assurer ensuite que les principes recherchés n'ont pas été altérés par la dessiccation ou pendant le transport de la plante ; enfin, pour que les résultats sur la composition chimique soient probants, il est nécessaire de répéter les analyses sur des plants d'origines différentes et à divers stades d'évolution. Souvent donc, un travail chimique classique, avec isolement des constituants et caractérisation par des méthodes physiques et chimiques, ne sera possible que sur quelques espèces particulièrement abondantes à l'intérieur d'un genre. Pour les espèces dont on ne peut disposer qu'en petite quantité, il faudra procéder par comparaison avec les espèces bien étudiées, à l'aide de microméthodes analytiques. Même si on n'a pas ainsi la même certitude directe d'identification pour tous les composants, c'est souvent le seul moyen d'avoir un aperçu chimique valable d'un genre ou d'une famille botanique.

On a beaucoup discuté la *valeur taxonomique* des résultats obtenus par l'étude de la composition chimique. Les chimistes croient pouvoir, dans tous les cas, confirmer ou révolutionner la classification établie. Les botanistes, généticiens, ..., très attachés à la systématique existante, admettent difficilement qu'une science, totalement différente en apparence, puisse amener quelque progrès. Pour analyser la valeur du critère chimique, il est nécessaire d'une part de le comparer aux critères morphologique, anatomique, etc. et d'autre part, d'étudier la valeur taxonomique de nos connaissances chimiques actuelles.

On sait depuis DARWIN (1859) qu'il existe une évolution

morphologique dans le règne végétal, allant par divers embranchements des espèces arborescentes primitives jusqu'aux familles de plantes herbacées les plus évoluées, telles que les Composées ; on n'a pas pu mettre en évidence une évolution semblable ou parallèle de la composition chimique, puisqu'on retrouve des substances chimiques complexes (pigments, triterpènes p.ex.) dans les plantes les plus diverses. De plus, on note l'instabilité du *caractère chimique* d'une espèce, lié à quelques gènes seulement dans la plante ; il en résulte tantôt un rapprochement d'espèces morphologiquement très différentes, mais à gènes « chimiques » voisins, tantôt des divergences de la composition chimique à l'intérieur d'une espèce morphologiquement bien définie ; cette dernière possibilité a fait naître la notion de races chimiques, si importante dans la culture des plantes médicinales, sur laquelle nous reviendrons plus loin (chapitre VI). Pour donner une valeur taxonomique au caractère chimique, il ne suffit donc pas de varier les essais chimiques pour éliminer l'influence des facteurs extérieurs (sol, climat, etc.) ; il faut également analyser un grand nombre de constituants de la plante, de façon à faire intervenir le maximum de gènes possible dans la comparaison des espèces.

Dans ces conditions, *le critère chimique peut, à notre avis, avoir une valeur équivalente à celle des critères morphologique et autres, mais il ne peut, en aucun cas, se substituer à eux.* La solution la plus logique consiste certainement à utiliser les résultats chimio-taxonomiques à l'intérieur des grandes divisions de la classification existante, ceci d'un point de vue à la fois critique et dialectique.

A présent, il reste à savoir quelles sont les substances à choisir en priorité pour une étude chimio-taxonomique. L'expérience a montré que, selon leur valeur taxonomique, les constituants végétaux peuvent se répartir en deux groupes, évidemment d'une façon assez arbitraire :

Les *substances primaires ou fondamentales* sont celles qui interviennent dans le métabolisme des plantes et qui jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques de la vie ; elles sont identiques pour tous les végétaux et même pour tous les êtres vivants : oses, acides aminés et acides gras « habituels ». Il est clair que l'étude de ces substances ne peut servir à des fins taxonomiques. Certains constituants (amidons, protéïnes p.ex.), dérivés des précédents, dont nous ne savons décrire actuellement que la structure *globale*, restent également sans valeur taxonomique ; mais il semble certain que leur structure *fine* présentera des caractères qui seront, au moins en partie, spécifiques.

Par opposition, on appelle *substances secondaires ou élaborées* celles qui ne sont pas impliquées universellement dans des processus métaboliques et qui possèdent un certain nombre de caractères communs : ces substances sont presque toujours particulières à une ou plusieurs familles de plantes et il apparaît donc comme probable qu'elles ne possèdent pas de fonctions vitales ; elles sont généralement de structure chimique complexe et leur biogénèse nécessite des mécanismes enzymatiques nombreux ; souvent elles sont physiologiquement très actives (alcaloïdes, hétérosides p.ex.). Il est certain que c'est parmi les substances secondaires qu'on trouvera les constituants les plus intéressants pour la taxonomie chimique.

Souvent les limites entre les deux groupes de composants sont mal définies : telle substance, actuellement classée dans les substances secondaires, peut se révéler un jour comme un produit indispensable à certains métabolismes ; c'est le cas du sédoheptulose p.ex., extrait d'abord des feuilles de certaines Crassulacées, que l'on sait actuellement constituer une étape dans la formation des glucides par photosynthèse. Par ailleurs, un composant intéressant pour l'étude taxonomique d'une famille, peut ne présenter qu'un intérêt restreint pour une autre famille botanique.

En conclusion, on peut admettre que la répartition des substances secondaires, étudiée dans des conditions variées, constitue un critère très valable qui rendra certainement de grands services pour résoudre les problèmes taxonomiques et phylogénétiques du règne végétal.

Applications taxonomiques de la phytochimie

Dès 1910, le botaniste BAKER et le chimiste SMITH **(1)** collaborant à des recherches sur les *Eucalyptus* et les *Pinus* d'Australie, ont montré l'intérêt de ce genre d'études pour la classification systématique. Mais il faut attendre ces dix dernières années pour voir les recherches chimio-taxonomiques prendre un développement notable, ceci surtout sous l'impulsion d'ERDTMAN et de HEGNAUER. ERDTMAN est l'auteur de travaux importants sur les constituants du coeur de bois de Conifères **(2)**, mais on lui doit surtout l'énoncé des principes actuels de la chimio-taxonomie **(3)** . De son côté, HEGNAUER a étudié la signification taxonomique de certains groupes de substances secondaires (alcaloïdes, composés anthraquinoniques, etc.)**(4)** ; il est également l'auteur du premier ouvrage chimio-taxonomique dont seul le tome I, concernant les Crytogames et les Phanérogames Gymnospermes, a paru jusqu'ici (1962) **(5)** .

A présent, nous voudrions passer en revue les principaux groupes de substances étudiées en soulignant leur intérêt taxonomique :

Alcaloïdes.

Très souvent, un alcaloïde (ou un groupe d'alcaloïdes) est particulier à une famille ou à un genre botanique ; tantôt ces alcaloïdes se retrouvent dans tous les représentants de la famille (Lycopodiacées p.ex.), tantôt dans certains genres seulement (Renonculacées p.ex.), parfois uniquement dans certaines espèces d'un même genre (*Strychnos* p.ex.). Mais d'autres alcaloïdes, de structure relativement simple il est vrai, peuvent se retrouver dans des familles très différentes : p.ex. la nicotine a été isolée non seulement de Solanacées, mais aussi d'autres Dicotylédones et même de quelques Cryptogames. Parfois enfin, la nature des alcaloïdes permet de différencier deux genres voisins (dans la famille des Apocynacées, les genres *Vinca* et *Catharanthus* p.ex.). **(6)**

Hétérosides.

Tous les hétérosides cardiotoniques se caractérisent par une structure stéroïdique avec un noyau lactonique fixé en C_{17} ; mais alors que, dans les Dicotylédones *(Digitalis, Strophanthus),* ces hétérosides ont un noyau lactonique à cinq chaînons, ils présentent un noyau à 6 chaînons dans les Monocotylédones *(Scilla).* La présence fréquente d'hétérosides sulfurés dans les Crucifères, d'hétérosides cyanogénétiques dans les Rosacées, constitue également des caractères de famille intéressants.

Lignines, polyphénols et flavonoïdes.

On peut distinguer trois types de lignines suivant la nature de l'alcool entrant dans leur constitution. TOWERS et GIBBS **(7)** ont montré que les proportions de ces lignines sont en relation avec les grandes lignes de la classification systématique. Un « Phytochemical Survey » (étude superficielle, mais très étendue du règne végétal) des polyphénols, dû à BATE-SMITH **(8)** , a mis également en évidence une relation entre les proportions des polyphénols et la classification botanique. Dans le genre *Pinus,* les travaux d'ERDTMAN **(2)** pour les flavonoïdes ont confirmé les sections *Diploxylon* (aiguilles par 2) et *Haploxylon* (aiguilles par plus de 2).

Huiles essentielles et résines.

Par l'étude anatomo-morphologique, on sait depuis longtemps que certaines familles de plantes possèdent un appareil secréteur

contenant une essence susceptible de se résinifier. L'exemple le mieux étudié est encore celui des oléo-résines du genre *Pinus*, connues sous le nom de térébenthines ; cette étude, due à MIROV **(9)** , a montré l'influence prédominante des facteurs génétiques sur la composition des térébenthines et l'intérêt de la chimie pour mettre en évidence les hybridations fréquentes des pins.

Substances diverses.

La répartition des pigments, souvent décelables à l'examen morphologique, a déjà été utilisée dans la classification systématique (chez les Algues p.ex.). PLOUVIER **(10)** a retenu quelques dérivés de l'inositol et des acides voisins (acides quinique, shikimique) pour l'étude chimio-taxonomique des Conifères. Dans le même but, BOUGAULT et BOURDIER **(11)** , puis KARIYONE **(12)** ont examiné les cires des feuilles de Conifères. EGLINGTON **(13)** a pu aboutir à des conclusions taxonomiques intéressantes, par l'étude des cires de feuilles, dans la famille des Crassulacées.

Cet aperçu succinct des principaux travaux chimio-taxonomiques est destiné surtout à dégager la valeur taxonomique des principaux groupes de substances. On constate, en particulier, que des substances à structure peu variée, telles que les cires ou les polyphénols, doivent leur valeur taxonomique presqu'uniquement à leur composition quantitative. Ce ne sont donc que les constituants complexes tels que les alcaloïdes ou les hétérosides qui, par leur présence ou leur absence, peuvent donner des renseignements sur la classification systématique.

Parmi les travaux chimio-taxonomiques cités, on note l'engouement des auteurs pour les Conifères. Cet engouement s'explique peut-être en partie par l'intérêt taxonomique des premières recherches entreprises ; mais il est dû surtout à l'importance économique de la famille et à la relative facilité de disposer d'une quantité importante de matière première. Les travaux sur les familles à alcaloïdes et à hétérosides ont également été très poussés, puisqu'ils intéressent au premier chef l'industrie pharmaceutique qui recherche les espèces les plus rentables pour l'extraction d'un principe actif ; ceci est particulièrement net pour la famille des Apocynacées qui a donné lieu à d'innombrables travaux, chimiques et pharmacodynamiques, depuis la découverte des propriétés thérapeutiques de la réserpine.

Mais en dehors des familles botaniques qui présentent un intérêt économique immédiat, l'étude taxonomique des végétaux par leur composition chimique en est encore à ses débuts. Pour que cette science nouvelle puisse s'épanouir pleinement, il est indis-

pensable de mieux connaître les mécanismes biogénétiques dont disposent les végétaux pour arriver aux structures complexes des substances dites secondaires. Car des substances à structures apparemment assez éloignées peuvent parfois se rapprocher par leur précurseur ou leur mécanisme de formation identique ; ainsi il semble bien établi que les alcaloïdes de l'opium, longtemps classés en alcaloïdes phénanthréniques et isoquinoléiques, dérivent d'un même précurseur, la dihydroxyphénylalanine **(14)** . Inversement, des constituants à même squelette fondamental peuvent avoir des origines très différentes dans la plante ; c'est le cas des composés à structure anthraquinonique, comme l'a montré HEGNAUER **(4)** . Pour souligner le rôle primordial des considérations biogénétiques en chimio-taxonomie, on peut dire en conclusion, avec ERDTMAN **(3)** , que «la biogénèse est à la taxonomie chimique ce que l'embryologie est à la taxonomie classique».

But de la thèse :
étude chimio-taxonomique du genre Hypericum.

Au début de cet exposé, nous avons vu en quoi consiste une étude chimio-taxonomique ; nous en avons souligné l'intérêt ainsi que les méthodes de travail. La chimio-taxonomie offrait pour nous l'attrait d'une science en pleine évolution où se posent encore de nombreux problèmes d'identification de constituants, de leur répartition dans la plante, de leur biogénèse, etc.

Si nous avons choisi comme sujet d'étude le genre *Hypericum*, c'est surtout du fait que le genre *Dipterocarpus*, d'une famille botanique voisine, fait actuellement l'objet de travaux chimio-taxonomiques dans notre laboratoire **(15)** . Après les résultats intéressants pour la taxonomie, obtenus sur les oléo-résines de *Dipterocarpus*, il était extrêmement tentant de réaliser un travail analogue sur le genre *Hypericum*, qui possède également un appareil sécréteur. D'autre part, en dehors de l'hypéricine, la composition chimique du genre *Hypericum* est encore mal connue ; il était intéressant, en particulier, d'approfondir l'étude d'*H. perforatum* L., espèce très répandue dans nos régions et utilisée depuis très longtemps pour ses vertus curatives, surtout en médecine populaire.

Pour une étude taxonomique du genre *Hypericum*, l'hypéricine, matière colorante rouge, constituait la substance de choix. En effet, par sa structure complexe, parfaitement établie grâce aux travaux de BROCKMANN et collaborateurs (voir chapitre II), aussi bien que par sa localisation dans des glandes noires, caractéristiques du genre *Hypericum*, elle répond parfaitement aux conditions que doit remplir une substance secondaire.

L'étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* par l'huile essentielle semblait mériter également une place importante. D'abord la présence d'une essence dans un appareil sécréteur bien différencié constitue l'un des caractères les plus spécifiques du genre. De plus, la complexité de sa composition varie considérablement les points de comparaison entre espèces ; or on a vu que la comparaison de nombreux constituants était nécessaire pour donner au critère chimique une valeur taxonomique.

Il peut paraître étonnant que nous n'ayons retenu pour cette étude, ni les cires dont nous avons identifié les principaux constituants, ni les flavones signalées dans différentes espèces d'*Hypericum*. Nous avons laissé de côté les cires, puisque SALGUES (voir chapitre VII) a retrouvé dans la cire d'un *Hypericum* sud-américain le même carbure, l'octacosane, que nous avons isolé de celle d'*H. perforatum* L. ; la même raison est valable pour les flavones qui, d'après les recherches effectuées, ne semblent guère varier d'une espèce à l'autre.

En optant pour un sujet d'étude aussi peu exploré, nous nous sommes forcément heurté à de grosses difficultés. D'abord la classification botanique elle-même et la dénomination des espèces du genre *Hypericum* sont encore incertaines ; il en est résulté des difficultés dans l'identification botanique et surtout dans la culture des espèces, obtenues à partir de graines souvent mal nommées (plus de 50 %). D'autre part, l'étude de l'essence nécessite la plante fraîche et les espèces étudiées se sont généralement avérées pauvres en essence (rarement plus de 1 g par kg de plante fraîche). Enfin, du point de vue chimique, la composition très complexe des essences (souvent 25 composants) a gêné considérablement l'isolement des constituants à l'état pur (voir figure 6).

Du fait que, pour la majorité des espèces d'*Hypericum* examinées, nous disposions seulement d'une faible quantité d'essence (moins de 500 mg et souvent moins de 100 mg), nous avons été amené à mettre au point ou à perfectionner des microméthodes analytiques pour les essences. Nous verrons, en particulier, l'intérêt de la chromatographie fonctionnelle sur couche mince, de la combinaison des chromatographies sur couche mince et en phase gazeuse ainsi que de la chromatographie gazeuse effectuée directement sur un échantillon de plante. Ces méthodes, mises au point pour l'étude des essences d'*Hypericum*, pourront être utilisées pour l'étude chimio-taxonomique d'autres familles à essences. De même, la méthode d'empreinte chromatographique que nous préconisons pour l'identification de l'hypéricine, est certainement susceptible d'applications à

d'autres substances naturelles, à condition de l'adapter à chaque cas particulier.

Ayant ainsi exposé les raisons et les méthodes de notre travail, nous donnons les grandes lignes du plan que nous suivrons :

Partie théorique

Chap. I : Partie botanique, avec la culture et l'identification des espèces d'*Hypericum.*

Chap. II : Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* par l'hypéricine. Comparaison des matières colorantes des Hypéricacées et des Clusiacées.

Chap. III : Méthodes d'isolement et d'analyse des huiles essentielles.

Chap. IV : Identification de constituants des essences d'*Hypericum.*

Chap. V : Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* par les huiles essentielles.

Chap. VI : Hybridation et composition des essences d'*Hypericum.*

Chap. VII : Etude de l'extrait éthéré d'*H. perforatum* L.

Partie expérimentale

CHAPITRE I

PARTICULARITES BOTANIQUES DU GENRE HYPERICUM

Position systématique et classification du genre Hypericum

C'est JUSSIEU, en 1789, qui est le premier auteur à citer la famille des Hypéricacées. CHOISY (1821) publie une monographie et SPACH (1833) divise la famille en 28 genres. On doit à BENTHAM et HOOKER (1862) la classification actuelle en 8 genres dont le genre *Hypericum* *.

La position du genre *Hypericum* dans la classification systématique n'est pas encore définitivement établie. Les ouvrages de botanique systématique et de phylogénie ont, à ce sujet, des opinions divergentes. ENGLER **(17)** range le genre *Hypericum* dans la famille des Guttiféracées et la sous-famille des Hypéricoïdées ; l'ouvrage de WETTSTEIN **(18)** (1935) ainsi que ceux très recents de RENDLE **(19)** (1959) et d'EMBERGER **(20)** (1960) confirment cette position. D'autre part, HUTCHINSON **(21)** (1959) et TAKHTAJAN **(22)** (1959), dans leurs classifications phylogénétiques des Angiospermes, et AUBREVILLE **(23)** (1959), dans sa flore de la Côte d'Ivoire, distinguent deux familles : les Clusiacées ou Guttiféracées et les Hypéricacées; cette dernière famille comprend les huit genres proposés déjà par BENTHAM et HOOKER et elle correspond aux Hypéricoïdées d'ENGLER. Nous n'avons pas à discuter ici les différentes classifications, mais nous retiendrons pour le genre *Hypericum* la position systématique suivante :

Embranchement :	Phanérogames
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dialypétales
Ordre :	Guttiférales
Famille :	Hypéricacées.

La classification des espèces à l'intérieur du genre *Hyperi-*

cum est encore beaucoup plus incertaine. Ce genre qui ne comprend pas moins de 300 espèces a été étudié en particulier par CHOISY, SPACH et BOISSIER *. Grâce à ces travaux, KELLER **(17)** , dans le traité d'ENGLER et PRANTL (1895 et 1925), a pu établir une classification du genre en dix-huit sections, d'importance très inégale ; le principal défaut de cette classification est le manque de netteté des subdivisions de la vaste section *Euhypericum*. Cette lacune est comblée, en grande partie, par le travail important de STEFANOFF **(24)** (1942).

Malheureusement, en dehors des travaux non publiés de ROBSON **(25)** , rien n'a été fait pour corroborer ou infirmer les résultats de KELLER et de STEFANOFF. *Au cours de notre travail, nous utiliserons donc la classification de KELLER, seule classification complète connue, en tenant compte de celle de STEFANOFF pour la section Euhypericum.*

Répartition géographique des Hypéricacées

En général, les Hypéricacées sont des plantes des régions tropicales et équatoriales d'Asie, d'Afrique et d'Amérique. Seul le genre *Hypericum* possède un certain nombre de représentants dans les pays tempérés et méditerranéens. Sur plus de 300 espèces connues, on trouve environ quinze espèces d'*Hypericum* en France et une centaine en Asie Mineure et en Europe orientale ; la plupart de ces espèces appartiennent à la section *Euhypericum*. Les espèces des sections *Myriandra, Brathydium* et *Brathys* sont presqu'exclusivement américaines, alors que celles des sections *Norysca* et *Eremanthe* sont d'origine asiatique. Il est intéressant de noter que les représentants africains du genre, peu nombreux, se rangent presque tous dans la section *Campylosporus*. *Il semble donc exister une relation entre la morphologie des espèces et leur origine géographique.*

Caractères morphologiques des Hypéricacées

Les Hypéricacées sont des plantes herbacées ou arborescentes, à feuilles opposées ou verticillées, ce qui les différencie de la famille des Diptérocarpacées à feuilles alternes. Les fleurs actinomorphes sont solitaires ou, plus souvent, groupées en inflorescences cymeuses. Le calice et la corolle sont pentamères sauf dans le genre *Ascyrum* où ils sont tétramères. Les étamines nombreuses sont presque toujours groupées en 3 ou 5 faisceaux. L'ovaire

* Pour les références anciennes, nous renvoyons à WEILL (16)et à ENGLER(17).

supère présente un nombre de loges variable ; les ovules, toujours nombreux, sont à placentation axile (différence entre Guttiférales et Pariétales). Les styles sont le plus souvent libres ou seulement soudés à la base, alors que les Clusiacées présentent des styles soudés, souvent très courts.

La nature du fruit permet de diviser les Hypéricacées en trois sous-familles : les Hypéricées (genres *Ascyrum* et *Hypericum)* se reconnaissent à leur port (herbes ou buissons) et à leur capsule le plus souvent septicide. Les Cratoxylées et les Vismiées sont des plantes arborescentes : les Cratoxylées (genres *Cratoxylon, Eliaea)* se caractérisent par un ovaire à 3 loges et une capsule loculicide en général ; les Vismiées (genres *Vismia, Psorospermum, Haronga* et *Endodesmia)* possèdent, au contraire, un ovaire à 5 loges et un fruit charnu (baie ou drupe).

A l'intérieur de la sous-famille des Hypéricées, le genre *Ascyrum* (4 espèces) ne diffère du genre *Hypericum* que par sa fleur tétramère. ROBSON **(25)**, considérant sans doute ce caractère comme secondaire, inclut le genre *Ascyrum* dans la section *Myriandra* du genre *Hypericum.* On peut donc pratiquement superposer l'étude des Hypéricées à celle du genre *Hypericum.*

Il serait trop long de donner les caractères morphologiques distinctifs de toutes les espèces d'*Hypericum* étudiées. Dans le paragraphe concernant l'identification des espèces, nous indiquerons les principaux ouvrages consultés dans ce but.

Caractères anatomiques des Hypéricacées

On sait depuis longtemps que les familles des Hypéricacées et des Clusiacées se caractérisent par la présence d'un appareil sécréteur et qu'elles se différencient ainsi de la famille voisine des Théacées. Mais alors que les Clusiacées sécrètent avant tout des résines ou des gommes-résines, les Hypéricacées contiennent des huiles essentielles dans leur appareil sécréteur. Cet appareil avait été étudié, dès 1885, par VAN TIEGHEM **(26)**. En 1903, WEILL **(16)** fait une étude anatomique approfondie d'environ 40 espèces d'*Hypericum ;* il montre que les résultats, assez uniformes, ne permettent pas une application taxonomique. Récemment, BRUNARSKA **(27)** examine l'anatomie de quelques espèces d'*Hypericum*, indigènes et ornementales, BROUTIN **(27 bis)** celle de la feuille des Clusiacées.

Dans le genre *Hypericum,* l'appareil sécréteur comprend : des poches sécrétrices dans le limbe des fleurs et des feuilles, des

canaux sécréteurs dans les racines et les tiges ainsi que dans les pétioles et les nervures des feuilles. Ce sont les poches sécrétrices translucides qui constituent les «perforations» des feuilles d'*H. perforatum* L. Parmi les espèces étudiées par WEILL, *H. calycinum* L. se distingue nettement par sa grande richesse en organes sécréteurs, d'où, comme nous le verrons, sa teneur élevée en huile essentielle.

Le mode de formation des poches sécrétrices différencie nettement les Hypéricacées de familles à essences voisines (Rutacées, Myrtacées) : le méat est formé par écartement de quatre cellules ; les cellules périphériques se divisent parfois et deviennent plus volumineuses, mais elles ne se résorbent jamais. C'est ce qu'on appelle la formation schizogène, mise en évidence par VAN TIEGHEM **(26)** , par opposition à la formation lysigène des poches chez les Rutacées ou les Myrtacées.

En dehors de l'appareil sécréteur normal, certaines espèces d'*Hypericum* présentent des glandes noires sur les feuilles et les fleurs, rarement sur les tiges. Ces glandes contiennent une matière colorante, l'hypéricine, sur laquelle nous reviendrons. Selon WEILL , chaque glande se formerait à partir du contenu d'un groupe de cellules dont les parois seraient probablement résorbées **(16)**.

Origine et culture des espèces d'Hypericum

Parmi les espèces d'*Hypericum* étudiées, certaines ont été cueillies à l'état spontané en Alsace ; diverses espèces à grandes fleurs, cultivées comme plantes décoratives, ont été récoltées dans des jardins d'ornementation. Pour les autres espèces qui ne se trouvent qu'à titre d'échantillons dans les jardins botaniques, la culture à partir des graines s'est avérée nécessaire. On trouvera dans le tableau 13 (partie expérimentale) l'origine des espèces étudiées.

Pour les espèces d'*Hypericum* en culture, nous avons procédé de la façon suivante : au printemps, les graines sont semées en pots ; lorsque les plants atteignent 2 à 10 cm, on les repique dans d'autres pots. En septembre, on les transplante en pleine terre ; au moment de la transplantation, nous utilisons les parties aériennes pour l'isolement de l'essence. Il est rare qu'une espèce d'*Hypericum* fleurisse au cours de la première année ; pour certaines espèces telles que *H. rhodopeum* Friv. ou *H. barbatum* Jacq., la floraison s'est même faite durant la troisième année seulement. La détermination botanique des espèces ne peut donc souvent se faire avec certitude qu'à partir de la deuxième année.

Identification des espèces d'Hypericum

Pour identifier les espèces d'*Hypericum* étudiées, nous avons utilisé les caractères morphologiques donnés par STEFANOFF et par les flores des pays d'origine; lorsque c'était possible, nous nous sommes servi également de la description due à l'auteur de l'espèce. Pour les espèces étudiées à l'état frais, nous avons complété l'identification par comparaison avec les échantillons de l'Herbier Général du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris et de celui de l'Institut de Botanique de Strasbourg.

En dehors du travail de STEFANOFF **(24)** qui a étudié surtout les espèces d'*Hypericum* des pays tempérés, méditerranéens et d'Asie Mineure, les principaux ouvrages qui nous ont servi à l'identification des espèces, sont les suivants :

Régions tempérées : les flores de ROUY **(28)** (France) et de HEGI **(29)** (Europe centrale) ainsi que le travail de WILHELM **(30)** sur la morphologie et la caryologie de quelques espèces d'*Hypericum.*

Europe orientale et Proche-Orient : les flores de BOISSIER **(31)** , auteur de nombreuses espèces d'*Hypericum,* et de HALACSY **(32)** (Grèce).

Asie centrale et orientale : les flores de HOOKER **(33)** (Inde) et de MAXIMOWICZ **(34)** (Asie centrale et Chine).

Afrique : les flores d'OLIVER **(35)** (Afrique centrale et orientale) et de HUMBERT **(36)** (Madagascar).

Amérique du Nord : les flores de GRAY **(37)** , de BRITTON and BROWN **(38)** et d'ABRAMS **(39)** .

Amérique du Sud : toutes les espèces d'*Hypericum* font partie de la section *Brathys* de la classification de KELLER et parmi celles que nous avons étudiées, aucune n'a montré la présence d'hypéricine ; c'est pourquoi, pour l'identité de ces espèces, nous nous sommes fié aux déterminations faites sur l'Herbier du Muséum de Paris, en vérifiant simplement qu'il n'y avait pas d'erreur de section.

Les espèces dites ornementales (sections *Eremanthe, Norysca, Androsaemum, Myriandra* et sous-section *Olympia)* ont également été identifiées d'après les manuels de plantes horticoles de REHDER **(40)** et de BAILEY **(41)** ainsi que d'après les ouvrages illustrés de SCHNEIDER **(42)** et de DIPPEL **(43)** .

Pour certaines espèces, utilisées pour l'analyse de l'essence, dont l'identification restait douteuse, nous avons soumis des échantillons au Dr N.K.B. ROBSON **(25)** (British Museum, Natural History), auteur d'une classification systématique et phylogénétique du genre *Hypericum* non encore publiée.

CHAPITRE II

ETUDE CHIMIO-TAXONOMIQUE DU GENRE HYPERICUM PAR L'HYPERICINE, MATIERE COLORANTE ROUGE

Structure chimique des matières colorantes des Hypéricacées et des Clusiacées

Depuis fort longtemps, on sait que l'expression des fleurs du millepertuis, *H. perforatum* L., donne un suc coloré en rouge auquel les auteurs anciens attribuaient souvent l'activité physiologique de la plante. Pourtant ce n'est qu'à la suite des longs travaux de BROCKMANN et coll. **(44)** (1939-1957) que l'on connaît actuellement la structure des substances responsables de la coloration rouge : l'hypéricine et la pseudo-hypéricine. Plus récemment encore (à partir de 1953), on a élucidé la structure de nombreuses matières colorantes des Clusiacées et des Hypéricacées. Il nous a paru intéressant de faire le point de nos connaissances actuelles sur ces pigments et de voir si leur étude est susceptible de présenter quelque valeur taxonomique.

Dans le tableau 1, nous avons groupé les matières colorantes d'après leur origine botanique et leur type de structure ; le tableau 2 donne leurs formules développées, actuellement admises, en rapprochant les substances de structure voisine. Comme ces formules, très complexes, n'ont pu être déterminées que très récemment, certaines d'entre elles prêtent à discussion. Pour la morelline, des formules très différentes ont été publiées par divers auteurs **(52)** ; mais il semble que sa structure soit définitivement établie grâce aux travaux de KARTHA et coll. **(53)** (1963) qui ont étudié son spectre de rayons X. Pour les guttifférines et les acides gambogiques, tous isolés de *Garcinia morella* Desr., il subsiste même un doute quant à leur identité ; ceci est dû au fait que la structure des acides gambogiques, décrite par AMOROSA et LIPPARINI **(49)** , est encore inconnue ; dans un travail récent, GUPTA et ses coll. **(57)** ont démontré que les acides gambogiques étaient différents, en tout cas, des guttifférines.

TABLEAU 1

Origine botanique	Partie de plante utilisée	Matière colorante	Type de structure	Références
HYPERICACEES				
Hypericum divers	ponctuations noires de divers	hypéricine	anthranol	44
»	organes	pseudo-hypéricine	»	44
Psorospermum guineense Hochr.	»	?	?	45
Haronga madagascariensis Choisy	écorce	harunganine	anthranol	46
Cratoxylon celebicum Blume	»	célébixanthone	chromone	47
CLUSIACEES				
Garcinia mangostana L.	écorce	mangostine	chromone	48
Garcinia morella Desr.	gomme-gutte	acides α - et β -	?	49
(et espèces voisines)	= « gamboge »	gambogiques		
»	»	β -guttilactone	dérivé chromone	50
»	graine	α -guttiférine	coumarine	51
»	»	morelline	chromone	52, 53
Calophyllum brasiliense Camb.	coeur du bois	jacareubine	»	54
Calophyllum inophyllum L.	graine	acide calophyllique	»	55
»	»	inophyllolide	chromone + coumarine	55
»	»	calophyllolide	coumarine	55
Mammea americana L.	»	mamméine	»	56
»	péricarpe fruits	coumarine II *Mammea*	»	56

N.B. Coumarine II *Mammea* = 4-phényl-5,7-dihydroxy-6-isovaléryl-8-isopentényl-coumarine.

TABLEAU 2

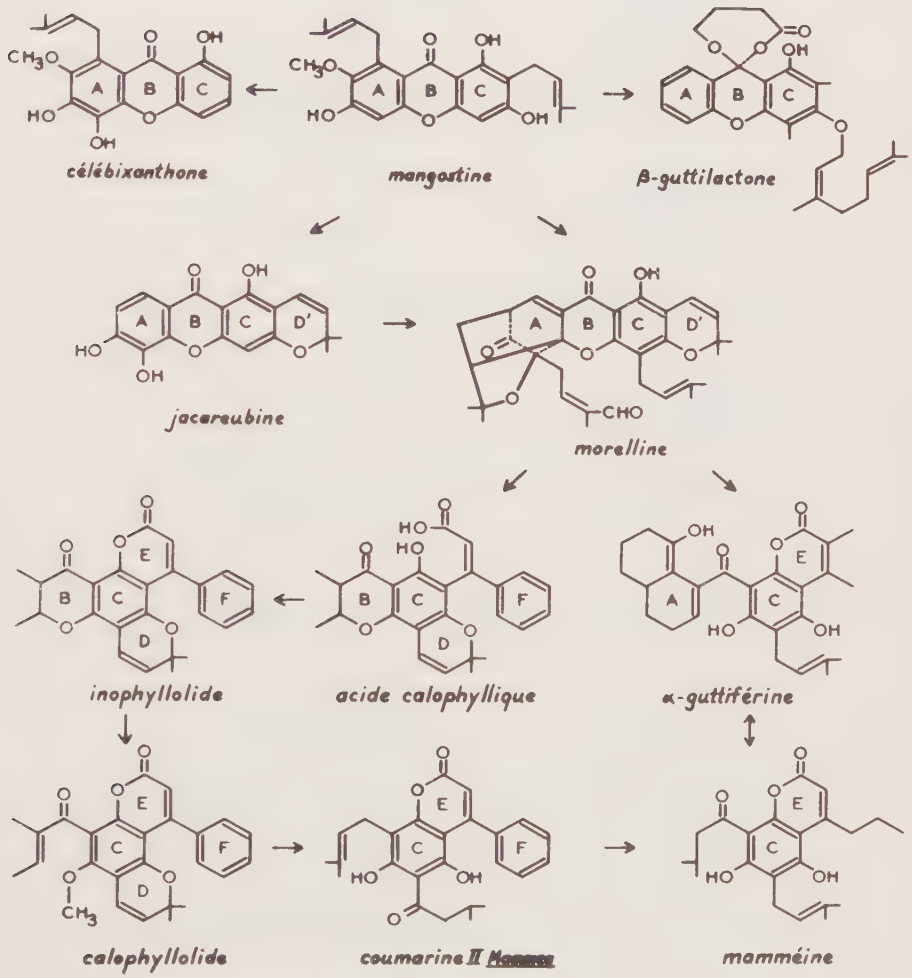
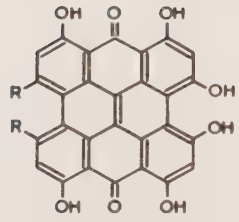
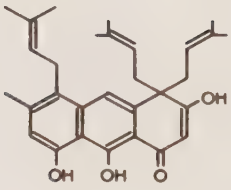

célébixanthone
mangostine
β-guttilactone
jacareubine
morelline
inophyllolide
acide calophyllique
α-guttiférine
calophyllolide
coumarine II Mesua
mamméine

TABLEAU 3



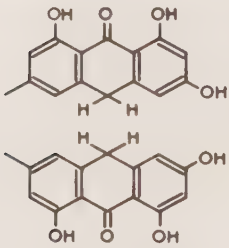
R=-CH_3 : *hypéricine*

R=-CHOH-CH_3 : *pseudo-hypéricine*



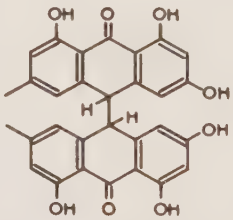
harungenine

Biogénèse de l'hypéricine (BROCKMANN **)



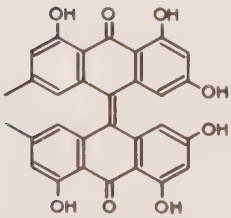
émodine-anthrone
(2 molécules)

-2 H →



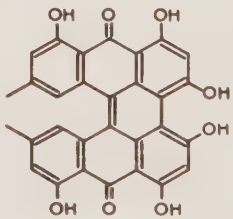
di[émodine-anthrone]
non isolée

-2 H →



hypérico-déhydro-dianthrone

-2 H →



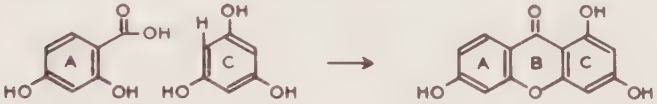
protohypéricine

-2 H → *hypéricine*

TABLEAU 4

Anthranols : *cyclisation d'une chaîne polyacétique (RICKARDS [58])*

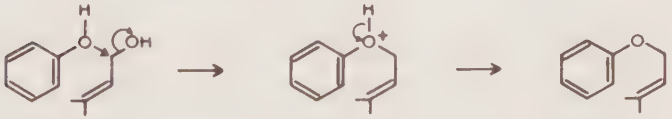
Xanthones : *phloroglucinol + acide aromatique (SESHADRI [59])*



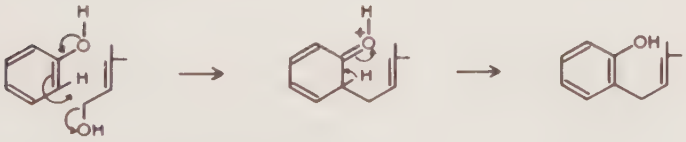
Coumarines : *phloroglucinol + acide β-cétonique (WHALLEY [58])*
(condensation de PECHMANN)

Mécanisme de fixation de la chaîne diméthylallyle (OLLIS [58])

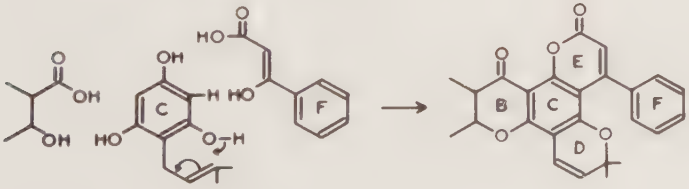
- sur un -OH phénolique :



- en α d'un -OH phénolique :



Biosynthèse de l'inophyllolide :



A notre avis, la structure des guttiférines **(50,51)** mériterait également une confirmation et nous donnons leurs formules avec quelque réserve.

Cependant, il est probable que les structures des matières colorantes ne subiront plus que des modifications de détail qui n'auraient aucune incidence dans une étude taxonomique. Afin de comparer les formules dans un but taxonomique, il faut avant tout examiner leur type de structure et essayer de reconstituer leur mode de formation. C'est pourquoi, nous donnons, dans le tableau 4, les voies biogénétiques qu'on peut envisager pour les composés colorés des Clusiacées et des Hypéricacées. Les tableaux 2, 3 et 4 font ressortir très nettement les différences de structure et de biogénèse entre les pigments anthranoliques rougeâtres (hypéricine, harunganine) et les pigments jaunes, coumariniques ou chromoniques. A notre connaissance, aucune biosynthèse n'a été démontrée sur ces matières colorantes jusqu'à présent.

Quoique le *squelette anthranolique* puisse avoir d'autres origines **(4)** , on peut supposer qu'il apparaît par fermeture d'une chaîne polyacétique, puis aromatisation de certains cycles formés **(58)**, ce qui conduit à l'émodine-anthranol (tableau 4). Pour l'hypéricine, la biosynthèse à partir de l'émodine-anthranol semble bien établie, puisque BROCKMANN **(44)** a isolé la plupart des substances intermédiaires. Quant à l'harunganine, on imagine aisément la fixation de plusieurs unités isoprèniques sur l'émodine-anthranol suivant le mécanisme indiqué par OLLIS **(58)** . Hypéricines et harunganine, toutes dérivées de l'émodine-anthranol, sont donc incontestablement très voisines. On peut imaginer une cyclisation et aromatisation analogues pour des pigments non anthranoliques comme la mangostine ; mais, dans ce cas, la biosynthèse polyacétique est moins évidente et elle suppose la fixation de groupements - OH surnuméraires.

Pour les *composés chromoniques ou coumariniques*, apparemment assez différents entre eux, nous avons désigné les cycles par des lettres (tableau 2). De cette façon, on voit nettement que le cycle C présente toujours la structure du phloroglucinol, sauf dans la célébixanthone, dérivée du résorcinol. D'ailleurs SESHADRI **(59)** a montré que la structure chromonique (cycles B et C) peut résulter de la condensation d'un phloroglucinol substitué avec un acide aromatique (cycle A) ou aliphatique. De plus, certaines matières colorantes (mamméine, calophyllolide) présentent un cycle B ouvert et constituent probablement des intermédiaires dans cette condensation.

Les cycles D et D' résultent de la fermeture d'une chaîne isopentényle sur l'un des - OH libres du phloroglucinol, suivant le

mécanisme indiqué dans le tableau 4; d'ailleurs, certaines matières colorantes présentent un cycle D ouvert (mangostine, mamméine p. ex.). Pour les cycles coumariniques E, la biosynthèse se fait sur le modèle de la condensation de PECHMANN (tableau 4) **(58)** , mais le mécanisme reste valable, même si le cycle F est remplacé par une chaîne aliphatique.

A l'aide des mécanismes biogénétiques que nous venons d'examiner, on peut imaginer la biosynthèse de toutes les matières colorantes des Clusiacées et des Hypéricacées; dans le tableau 4, nous donnons une biosynthèse possible de l'inophyllolide, de structure particulièrement complexe. On voit que les substances chromoniques et coumariniques ont une origine biogénétique très voisine et un précurseur commun : *le phloroglucinol;* elles présentent d'ailleurs une évolution structurale presque continue que nous avons essayé de souligner dans le tableau 2. Ces substances forment donc un groupe unique, par opposition aux pigments anthranoliques.

Il s'agit, à présent, de savoir si les résultats donnés par l'étude chimique des matières colorantes présentent une application taxonomique. Jusqu'à la détermination très récente de la structure de la célébixanthone, les conclusions pouvaient paraître claires : d'une part, les substances anthranoliques avaient été isolées dans les Hypéricacées (genres *Hypericum* et *Haronga)*; d'autre part, les composés chromoniques et coumariniques provenaient exclusivement de Clusiacées (genres *Garcinia, Calophyllum* et *Mammea).* La découverte de la célébixanthone dans le genre *Cratoxylon* (Hypéricacées) remet tout en question. En effet, il semble exclu que la place du genre *Cratoxylon* dans les Hypéricacées puisse être mise en doute. Le cas «aberrant» de la célébixanthone ne peut s'expliquer non plus par les variations de la partie de plante étudiée (tableau 1). On pourrait encore invoquer que la célébixanthone est le seul pigment du groupe des chromones et des coumarines à dériver du résorcinol et non du phloroglucinol; mais il s'agit là d'un caractère secondaire dont la valeur taxonomique est douteuse. Il faudra donc attendre une étude plus étendue des pigments des Clusiacées et des Hypéricacées pour savoir si le cas de la célébixanthone est exceptionnel ou non.

Si on compare la structure des matières colorantes et la classification des espèces dont elles ont été isolées, on constate bien une proche parenté entre les substances isolées d'une même espèce (p.ex. *Calophyllum inophyllum* L. ou *Mammea americana* L.). Mais la coumarine II de *Mammea* est au moins aussi proche du calophyllolidé que de la mamméine; la jacareubine et l'acide calophyl-

lique, tous deux isolés du genre *Calophyllum,* ont une parenté moins évidente que la jacareubine et la mangostine, de genres différents.

De cette étude taxonomique par les matières colorantes, on peut néanmoins, à notre avis, tirer *deux conclusions importantes :* d'abord la place à part occupée par les pigments anthranoliques qui ont été retrouvés jusqu'ici seulement dans les Hypéricacées et toujours dans des glandes anatomiquement bien différenciées ; d'autre part, la parenté biogénétique et structurale des pigments chromoniques et coumariniques qui séparent nettement les Clusiacées des familles botaniques voisines.

Travaux antérieurs concernant l'hypéricine

L'*histoire de l'hypéricine* est liée avant tout à la découverte de ses propriétés phototoxiques. Sans pouvoir le démontrer formellement, on soupçonnait depuis longtemps la matière colorante rouge d'être responsable des intoxications du bétail par certaines espèces d'*Hypericum.* Ces intoxications ne surviennent que chez les animaux à pelage clair et après exposition au soleil ; elles se manifestent d'abord par l'apparition de plaques érythémateuses et d'ulcérations, puis par des troubles d'ordre général (dérèglement de l'homéothermie), amenant la mort souvent rapide de l'animal. L'étude de l'étiologie de cette maladie à laquelle on a donné le nom d'«hypéricisme», a fait l'objet de nombreux travaux dont BROCKMANN a fait une mise au point **(44)** . La même phototoxicité se retrouve également avec le sarrasin («fagopyrisme»). Très récemment, SALGUES a publié les résultats de ses recherches concernant l'hypéricisme **(60)** et le fagopyrisme **(61)** .

Pour pouvoir incriminer l'hypéricine à coup sûr, il fallait préalablement l'isoler à l'état pur. Dès 1830, BUCHNER **(62)** , étudiant *Hypericum perforatum* L., mit en évidence la matière colorante rouge qu'il appela «rouge d'*Hypericum*». DIETERICH **(63)** (1891), puis ČERNY **(62)** (1911) et IOANNIDES **(64)** (1930) essaient d'améliorer le procédé d'isolement de l'hypéricine à partir de la plante. WOLFF **(65)** (1895) est le premier à étudier le spectre U.V., mais sur un produit encore impur. SIERSCH **(66)** , en 1927, classe l'hypéricine parmi les anthocyanes d'après ses propriétés analytiques. Il faut attendre les travaux de BROCKMANN et coll. **(44)** (1939-1957) pour connaître la structure chimique et les propriétés physiques de l'hypéricine ; c'est d'ailleurs l'étude des propriétés physiques qui a montré la présence simultanée de pseudo-hypéricine dans certaines espèces d'*Hypericum.*

Mise en évidence, dosage et extraction de l'hypéricine.

L'hypéricine est une substance rouge foncé, chimiquement très stable, ce qui permet de la retrouver intacte dans des échantillons d'herbier très anciens ; mais son inertie vis-à-vis de la plupart des réactifs rend difficile sa caractérisation directe sur la plante.

La *caractérisation de l'hypéricine* peut se faire de plusieurs façons : fluorescence et spectre d'absorption dans l'U.V. et chromatographie sur papier. Déjà les premiers auteurs signalent que le pigment rouge prend une teinte verte en milieu alcalin ; de même, dans l'ultra-violet, il présente une fluorescence rouge intense qui vire au vert clair par alcalinisation. Une méthode de caractérisation plus spécifique consiste à mesurer les longueurs d'onde correspondant aux maximums des bandes d'absorption de l'hypéricine ; les valeurs des max. ont été déterminées, dès 1939, par BROCKMANN et coll. **(67)** d'une part, PACE et MACKINNEY **(68)** d'autre part. Récemment, KUČERA **(69)** a utilisé la chromatographie sur papier en vue de la caractérisation de l'hypéricine.

Pour le *dosage de l'hypéricine*, les auteurs utilisent tantôt le spectrophotomètre **(60, 70, 71)** , tantôt le colorimètre **(72, 73)** . En 1943, SCHEIBE et SCHÖNTAG **(74)** déterminent les coefficients d'extinction qui correspondent aux bandes d'absorption de l'hypéricine et qui sont indispensables à la méthode spectrophotométrique. Le procédé colorimétrique, moins spécifique, nécessite l'élimination rigoureuse de toute substance gênante, en particulier l'hypérine, flavonoside non spécifique des *Hypericum*. HAGEDORN et NEU **(75)** ont mis au point une méthode de dosage photométrique sur des complexes colorés de l'hypéricine avec divers ions métalliques.

L'*extraction de l'hypéricine* de la plante peut être réalisée suivant diverses techniques, très voisines entre elles. Ceci s'explique par la faible solubilité de l'hypéricine dans les solvants usuels. L'hypéricine de la plante peut être extraite par le méthanol ou la pyridine. Une fois cristallisée, elle est très peu soluble dans le méthanol, mais soluble dans le méthanol contenant un peu de pyridine. BROCKMANN émet l'hypothèse que, dans la plante, l'hypéricine est liée à des constituants basiques jouant le même rôle que la pyridine **(70)** .

Le principe de l'extraction est donc en général le suivant : élimination des substances de ballast (chlorophylle, autres pigments, graisses) par un solvant tel que l'éther qui ne touche pas l'hypéricine ; puis action du méthanol qui donne une solution d'hypéricine

presque pure, encore souillée d'un peu de chlorophylle et d'hypérine.

Certains auteurs (**76**) préconisent la dissolution de l'hypéricine dans l'huile pour son dosage, mais la dissolution est beaucoup plus lente.

Répartition de l'hypéricine dans la plante.

Dans la plante, l'hypéricine est localisée dans des glandes, apparaissant sous forme de ponctuations ou de stries noires, visibles à l'oeil nu ou à la loupe. De nombreux botanistes signalent ces glandes noires, parfois même dans un but systématique. Suivant les espèces d'*Hypericum*, la répartition des glandes à hypéricine dans les différents organes de la plante est très variable ; de nombreuses espèces ne renferment pas de glandes à hypéricine. ROTH (**73**) et SIERSCH (**66**) ont recherché l'hypéricine dans les feuilles, les tiges, les sépales, les pétales et les étamines de 25 espèces environ.

Quoique la localisation de l'hypéricine dans les glandes noires soit bien démontrée, on ne peut exclure la présence dans le suc cellulaire d'une petite quantité d'hypéricine ou d'une substance très voisine, capable de se transformer en hypéricine au cours du dosage. En effet, BROCKMANN (**70**), par dosage spectrophotométrique, a montré la présence d'une petite quantité d'hypéricine dans les jeunes plants d'*H. hirsutum* L. sans fleurs ni fruits ; or les feuilles et les tiges de cette espèce ne présentent pas de ponctuations noires. Dans certains cas, les méthodes de dosage de l'hypéricine et la localisation des glandes noires peuvent donc aboutir à des conclusions différentes. Peut-être peut-on expliquer ainsi certains résultats, en apparence contradictoires, relevés dans la littérature et signalés dans le tableau 9.

Répartition de l'hypéricine dans le genre Hypericum.

La recherche de l'hypéricine du genre *Hypericum* a déjà été faite par différents auteurs (**60, 64, 66, 71, 73, 77, 78, 79**) sur environ 70 espèces. Dans le tableau 9, on trouvera les noms des auteurs pour les espèces déjà étudiées. Seuls BROCKMANN et coll. (**44**), **77**) ont différencié hypéricine et pseudo-hypéricine dans les espèces examinées, par une méthode de chromatographie circulaire. D'après les résultats obtenus par BROCKMANN sur 15 espèces, cette différenciation ne semble pas présenter un grand intérêt taxonomique. Par contre, VAN DER KUY et HEGNAUER (**71**), travaillant sur 12 espèces d'*Hypericum*, avaient constaté que les 9 espèces renfermant

de l'hypéricine faisaient partie de la section *Euhypericum* (cf. tableau 9), résultat que nous confirmerons nous-même.

Nous avons essayé d'aborder l'étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*

1° par la recherche de l'hypéricine dans les différentes espèces,
2° par l'étude de la répartition des glandes à hypéricine dans les organes de la plante.

Principe des méthodes d'analyse employées

Les méthodes que nous avons appliquées à la recherche de l'hypéricine varient suivant la nature de l'échantillon examiné : plante fraîche ou plante d'herbier. Nous n'avons effectué le dosage de l'hypéricine que sur les espèces disponibles à l'état frais ou récemment séchées par nous-même.

Méthodes de localisation non spécifiques de l'hypéricine.

Sur la plante fraîche ou récemment séchée, nous avons observé les ponctuations noires par l'examen à la loupe binoculaire, soit direct, soit après immersion de la plante dans l'eau bouillante. Sur les échantillons d'herbier anciens, les glandes noirâtres sont difficiles à déceler sur le fond brun ; dans ce cas, nous avons éclairci les parties de plantes examinées par un traitement à l'acide nitrique concentré, réactif qui n'attaque pas l'hypéricine dans les glandes durcies.

Méthode de localisation spécifique de l'hypéricine.

Pour montrer que les ponctuations noires sont bien dues à l'hypéricine (ou à la pseudo-hypéricine), nous avons mis au point une méthode d'empreinte permettant simultanément la localisation du pigment et sa caractérisation analytique. Cette méthode est applicable à des échantillons d'herbier même très anciens (plusieurs espèces étudiées datent de 1845). Elle consiste à employer la potasse alcoolique pour détruire le contenu cellulaire et ramollir ainsi l'échantillon de plante, puis l'acide acétique pour éclaircir l'échantillon noirci par la potasse ; les glandes à hypéricine résistent à ce traitement. On fait passer ensuite l'hypéricine sur un papier filtre imprégné de méthanol par application d'un fer à repasser chaud ; on obtient ainsi une empreinte nette des ponctuations permettant leur localisation

par leur coloration et leur fluorescence rouges (voir figures 1, 2 et 3). Si on presse l'échantillon à froid, on peut ensuite éluer le papier filtre à l'aide d'un solvant approprié et caractériser l'hypéricine par son R_F en chromatographie sur papier.

Dosage de l'hypéricine.

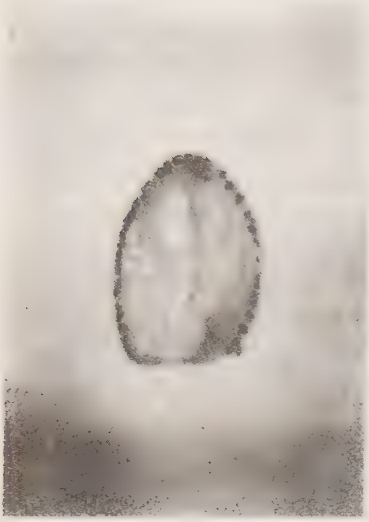
Pour le dosage de l'hypéricine, nous avons utilisé la méthode de BROCKMANN **(70)** dans ses grandes lignes : élimination des substances gênantes par l'éther, dissolution de l'hypéricine dans le méthanol, puis dosage spectrophotométrique sur la solution méthanolique, en utilisant le maximum à 590 m μ de la bande d'absorption la plus intense.

Résultats

Caractérisation et localisation de l'hypéricine (tableau 9).

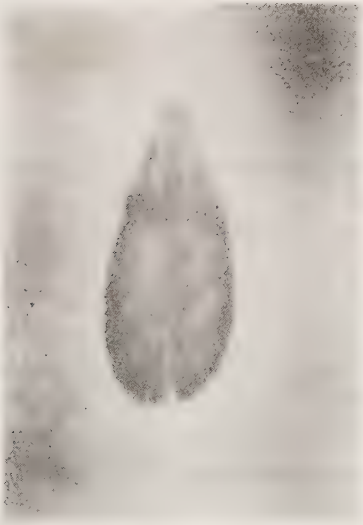
Pour la recherche de l'hypéricine, nous avons étudié environ 220 espèces d'*Hypericum* dont une cinquantaine est déjà signalée par divers auteurs ; nous avons examiné les plantes soit à l'état frais, soit sur l'Herbier Général de l'Institut de Botanique de Strasbourg, soit encore sur l'Herbier du Muséum d'Histoire Naturelle à Paris. Les différentes méthodes de caractérisation de l'hypéricine n'ont pas toutes été utilisées sur toutes les espèces. Certains échantillons d'herbier précieux (notamment ceux du Muséum) n'ont évidemment pu être utilisés que pour l'observation visuelle. Cependant, chaque fois que cela a été possible, plusieurs méthodes ont été utilisées. En aucun cas, nous n'avons eu à constater de divergence, même entre échantillons de provenances différentes, une fois rectifiées les erreurs d'identification.

Les résultats de la recherche de l'hypéricine figurent dans le tableau 9 (partie expérimentale). Les espèces sont disposées d'après la classification de KELLER **(17)** qui répartit le genre *Hypericum* en 18 sections. Pour les espèces étudiées par STEFANOFF **(24)** , nous indiquons parallèlement la place qu'elles occupent dans la classification proposée par cet auteur. A côté du nom de l'espèce, figurent son origine géographique et éventuellement les résultats des travaux antérieurs. On constate que la plupart des auteurs ont recherché l'hypéricine sans signaler sa répartition dans les organes de la plante. Nous ne faisons que citer les résultats obtenus par KARIYONE et KAWANO **(78)** sur des espèces japonaises que nous n'avons pas eu l'occasion d'examiner.



H. atomarium Boiss.
FIG. 1.

H. barbatum Jacq.
FIG. 2.



H. hircinum L. (sans hypéricine)
FIG. 3.

Le tableau 9 nous permet de faire les constatations suivantes:

1° L'hypéricine se retrouve principalement dans la grande section *Euhypericum* et la section *Campylosporus*. A l'intérieur de ces deux sections, les espèces où nous n'avons pas trouvé d'hypéricine sont rares.

2° Dans les autres sections, nous n'avons mis en évidence l'hypéricine que très rarement : *H. thasium* Griseb. (section *Thasium*), *H. gnidiaefolium* Rich. (section *Norysca*), *H. concinnum* Benth. (section *Androsaemum*), *H. peplidifolium* Rich. (section *Humifusoideum*) et *H. rhodopeum* Friv. (section *Campylopus*).

3° En dehors de la section *Euhypericum*, les espèces à hypéricine présentent des ponctuations noires sur les feuilles et les fleurs, jamais sur les tiges.

4° A l'intérieur de la section *Euhypericum*, la répartition de l'hypéricine est variable :
Absente dans la sous-section *Arthrophyllum* (3 espèces).
Uniquement dans les cils glanduleux des sépales pour les principales espèces de la sous-section *Coridium*.
Dans les sépales et les pétales pour une partie importante des sous-sections *Triadenioidea* et *Homotaenium* (surtout sections *Pulchra*, *Hyssopifolia* et *Hirtella* Stef.).
Dans tous les organes aériens (fleurs, feuilles et tiges) pour une grande partie de la sous-section *Heterotaenium* (section *Origanifolia* Stef.) et quelques espèces de la sous-section *Homotaenium* (section *Perforata* Stef.).
Dans fleurs et feuilles pour toutes les autres espèces.
N.B. La recherche de l'hypéricine sur plusieurs espèces du genre *Ascyrum* (*A. hypericoides* L., *A. stans* Michx.) s'est avérée négative.

Dosage de l'hypéricine (tableau 10).

Sur les espèces non encore étudiées dont nous disposions à l'état frais, nous avons effectué le dosage de l'hypéricine. ROTH **(73)** et BROCKMANN **(77)** ont déjà dosé l'hypéricine dans les 4 espèces de la partie supérieure du tableau 10 (partie expérimentale). Ces auteurs avaient obtenu des teneurs en hypéricine bien plus élevées, puisqu'ils étudiaient les parties aériennes fleuries. En examinant à la loupe les espèces du tableau 10, on constate que les espèces présentant la plus grande densité de ponctuations noires sont aussi celles qui ont la teneur en hypéricine la plus élevée.

Discussion

Le tableau 9 met en évidence quelques divergences de vue entre plusieurs auteurs et nos propres conclusions. Une grande prudence s'impose en la matière :

1° D'abord parce qu'un certain nombre d'espèces d'*Hypericum* sont encore mal définies et que certaines synonymies données par l'*Index kewensis* sont pour le moins douteuses.

2° Ensuite parce que les échantillons d'herbier sont souvent difficiles à examiner ; en outre, les pétales secs sont très fragiles et les glandes à hypéricine, presque toujours terminales, peuvent aisément disparaître accidentellement.

Quelques erreurs possibles de ce type n'enlèveraient rien aux conclusions systématiques d'ensemble que nous essayons de tirer.

L'étude des résultats nous permet d'affirmer que l'hypéricine est un constituant très général des espèces des sections *Euhypericum* et *Campylosporus*. Pour discuter les cas d'espèces à hypéricine, rencontrées dans d'autres sections, il est nécessaire d'étudier les bases de la classification de KELLER :

1° Etamines groupées en faisceaux ; sépales égaux, non foliacés.
   a) 5 faisceaux d'étamines, 5 styles.
      - Herbes à petites fleurs ..... section *Thasium*
      - Buissons à grandes fleurs .... sections *Campylosporus, Norysca, Eremanthe, Roscyna*
   b) 5 faisceaux d'étamines, 3 styles ;
      buissons ..... section *Androsaemum*
   c) 3 faisceaux d'étamines, 5 styles ;
      herbes à petites fleurs ..... section *Humifusoideum*
   d) 3 faisceaux d'étamines, 3 styles.
      - Buissons à grandes fleurs .... section *Webbia*
      - Herbes ou demi-buissons, à petites fleurs en général ..... section *Euhypericum*

2° Etamines libres ; 3 styles ; herbes à petites fleurs ; sépales égaux, non foliacés .... section *Campylopus*

3° Etamines libres ; 3 ou 5 styles ; sépales inégaux et foliacés .... sections *Myriandra, Brathydium* et *Brathys*.

Ce tableau, quoique schématique et très incomplet, permet de se rendre compte qu'une classification, axée uniquement sur le nom-

bre de faisceaux d'étamines et de styles, éloigne de la section *Euhypericum* des espèces à hypéricine qui en sont morphologiquement assez proches ; c'est le cas de *H. thasium* Griseb. (section *Thasium*), *H. peplidifolium* Rich. (section *Humifusoideum*) et *H. rhodopeum* Friv. (section *Campylopus*). Dans la section *Androsaemum*, *H. concinnum* Benth. est la seule espèce à hypéricine et aussi la seule espèce herbacée. D'ailleurs, ROBSON **(25)** rattache *H. thasium* Griseb. à la section *Drosocarpium* Stef. et *H. concinnum* Benth. à la section *Olympia* Stef., ce qui revient à inclure ces deux espèces dans la section *Euhypericum* de KELLER, *H. rhodopeum* Friv. se rapproche également de la section *Olympia* Stef. et la section *Humifusoideum* doit son nom à sa morphologie voisine de celle d'*H. humifusum* L., espèce de la section *Euhypericum*.

La position systématique de *H. gnidiaefolium* Rich., espèce à hypéricine, nous paraît également discutable ; c'est, en effet, la seule espèce africaine à l'intérieur de la section *Norysca* asiatique. Comme le montre le tableau ci-dessus, la section *Norysca* est très proche de la section africaine *Campylosporus* dont toutes les espèces étudiées renferment de l'hypéricine. Il doit donc être possible, à notre avis, de rattacher *H. gnidiaefolium* Rich. à la section *Campylosporus*.

La sous-section *Arthrophyllum*, sans hypéricine, est très proche de la sous-section *Triadenioidea* par ses caractères botaniques, de sorte que sa place dans la section *Euhypericum* semble indiscutable. Dans ce cas, la présence ou l'absence de l'hypéricine peut servir à différencier deux sous-sections voisines.

A l'intérieur de la section *Euhypericum*, la répartition de l'hypéricine dans la plante justifie certains remaniements de la classification, proposés par ROBSON **(25)** . Ainsi le fait de rattacher à la section *Montana* Stef. les espèces de la sous-section *Perforata* (α) Stef., comme le suggère ROBSON, présente un double avantage : on groupe dans la section *Montana* Robson toutes les espèces velues, à hypéricine dans fleurs et feuilles, alors que, dans la section *Perforata* Robson, on laisse seulement les espèces glabres, à hypéricine dans fleurs, feuilles et tiges (tableau 9). A notre avis, ROBSON réunit avec raison les sections voisines *Scabra*, *Hirtella* et *Hyssopifolia* Stef. dont la classification mériterait d'être révisée.

Les exceptions dans la répartition de l'hypéricine que signalent certains auteurs (tableau 9) et qui ne peuvent s'expliquer par des considérations botaniques, nous semblent attribuables à des confusions dans la détermination, souvent difficile, des espèces. Certains auteurs omettent de joindre les patronymes aux noms d'espèces, ce

qui rend parfois ambiguë l'interprétation de leurs résultats. Quant aux espèces japonaises, étudiées par KARIYONE et KAWANO **(78)**, nous connaissons seulement avec certitude la place de 7 espèces sur 23 espèces à hypéricine dans la classification de KELLER. Le fait que ces 7 espèces se classent dans la section *Eubypericum* est bien en accord avec nos conclusions.

La comparaison du *nombre chromosomique* des espèces d'*Hypericum* (NIELSEN **(80)**, CHATTAWAY **(81)**, HOAR **(82)**, WILHELM **(30)**) avec la répartition de l'hypéricine ne permet pas de rapprochement intéressant, ce qui, à notre avis, n'est pas surprenant pour deux raisons : comme l'a conclu NIELSEN, il n'y a pas de parallélisme non plus entre le nombre de chromosomes et la classification systématique; d'autre part, la composition chimique de la plante est liée à certains gènes, donc à certains chromosomes, mais non au nombre de chromosomes.

Conclusions

1° Par l'étude de la répartition de l'hypéricine, nous justifions l'existence des sections *Eubypericum* et *Campylosporus*. Pour ces deux sections, nous proposons le schéma suivant :

Présence d'hypéricine :
- 5 styles ; 5 faisceaux d'étamines ; buissons ..... sect. *Campylosporus*
- 3 styles ; 3 faisceaux d'étamines ; herbes ou demi-buissons .. sect. *Eubypericum*.

2° La répartition de l'hypéricine suivant les organes nous permet d'éclaircir la classification de la section *Eubypericum*. Elle justifie l'existence des sous-sections *Coridium*, *Arthrophyllum*, *Olympia* et *Triadenioidea* de KELLER et, dans une certaine mesure, des sections *Drosocarpium*, *Origanifolia*, *Perforata* et *Montana* de STEFANOFF et de ROBSON. Elle ne permet pas, à elle seule, une classification complète de la section *Eubypericum* ; mais en tenant compte également de quelques caractères botaniques, on peut schématiser cette classification de la façon suivante :

a) Demi-buissons ou petits buissons; hypéricine absente ou peu abondante :
   - Feuilles verticillées, linéaires; hypéricine dans les glandes ciliées des sépales seulement ..... sous-section *Coridium*
   - Feuilles opposées par deux :
     × hypéricine absente ..... sous-section *Arthrophyllum*
     × hypéricine présente dans les fleurs et parfois dans les

feuilles : toujours cils glanduleux noirs ..... sous-section *Triadenioidea*

× hypéricine présente dans les fleurs et les feuilles ; absence de cils glanduleux noirs .... sous-section *Olympia*

b) Herbes velues ; sépales à cils glanduleux noirs en général :

- Feuilles non embrassantes, linéaires en général ; hypéricine seulement dans les fleurs (tableau 9 : *assyriacum* à *tomentellum*)..... partie des sections *Hirtella* et *Hyssopifolia* Stef.
- Feuilles embrassantes ou semi-embrassantes :
  - × hypéricine dans fleurs et feuilles (tableau 9 : *delphicum* à *lusitanicum*) ..... sections *Montana* (b) et (c) et *Perforata* (a) Stef.
  - × hypéricine dans fleurs, feuilles et tiges (tableau 9 : *origanifolium* à *byzantinum*) ..... partie de la section *Origanifolia* Stef.

c) Herbes glabres ; sépales avec ou sans cils glanduleux noirs :

- Hypéricine dans fleurs, feuilles et tiges (tableau 9 : *aethiopicum* à *leprosum*) ..... parties des sections *Perforata* et *Origanifolia* Stef.
- Hypéricine abondante, en stries noires, dans les fleurs, peu abondante dans les feuilles en général ..... section *Drosocarpium* Stef.
- Hypéricine peu abondante dans les fleurs, présente ou absente dans les feuilles ..... toutes les autres espèces de la section *Euhypericum*.

En conclusion, il est donc indéniable qu'il existe certaines relations entre la répartition de l'hypéricine et les classifications du genre *Hypericum* de KELLER et de STEFANOFF ; certaines modifications de la classification botanique, proposées par ROBSON, pourraient encore améliorer ces relations. On a vu que l'hypéricine présente un intérêt taxonomique non seulement en tant que substance chimique, mais aussi par sa localisation dans des glandes anatomiquement bien différenciées.

CHAPITRE III

METHODES D'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES

Les procédés d'isolement et d'analyse des essences que nous décrivons, ont été utilisés ou mis au point sur des essences d'*Hypericum*. Si nous leur consacrons un chapitre particulier, c'est pour souligner qu'ils sont applicables à toutes les essences. Les méthodes d'analyse décrites sont particulièrement indiquées dans les cas où on dispose seulement d'une matière première en quantité très limitée.

Méthodes d'isolement et de fractionnement des essences.

Entraînement à la vapeur d'eau.

L'isolement des essences d'*Hypericum* a été effectué tantôt dans un appareil de CLEVENGER **(83)**, tantôt dans l'appareil de STAHL **(84)** utilisant le pentane comme solvant de l'essence. La méthode de STAHL permet de recueillir de petites quantités d'essence (jusqu'à un minimum de 10 mg) par simple décantation de la solution pentanique de l'essence et évaporation du pentane très volatil, sans séchage préalable. Elle a déjà été utilisée avec succès pour le dosage des essences d'*Hypericum* par ROTH **(85)**. Pour éviter toute perte de principes volatils, nous avons cependant jugé préférable de modifier le système réfrigérant comme le montre la figure 4 ; l'appareil original de STAHL possède un réfrigérant d'une seule pièce, moins efficace et moins maniable.

Distillation fractionnée.

Elle a été faite dans un appareil à bande tournante suivant la technique habituelle.

Chromatographie sur colonne.

Sur les essences ou les fractions d'essences, nous avons séparé les carbures des composés oxygénés par chromatographie sur

alumine : les carbures sont élués à l'éther de pétrole, les composés oxygénés avec un solvant plus polaire tel que l'éther. La silice est le meilleur adsorbant dont on dispose pour séparer entre eux les carbures, en particulier les terpènes ; mais pour aboutir à un produit pur, des chromatographies répétées sont nécessaires. L'emploi de la silice lavée à l'acide chlorhydrique, préconisée par BROCKMANN et MUXFELDT **(86)** (1956), a constitué un progrès sensible pour la séparation des terpènes, mais la préparation de cette silice est très complexe. A la fin de notre travail, nous avons utilisé de préférence la silice au nitrate d'argent, signalée très récemment par DE VRIES **(87)** (1962), permettant parfois l'isolement de terpènes en une seule chromatographie ; en se fixant sur les doubles liaisons, le nitrate d'argent retient sélectivement les carbures non saturés ; il faut alors utiliser un solvant plus polaire que l'éther de pétrole pour éluer les carbures les plus polaires.

Méthodes analytiques de caractérisation des essences

L'analyse des huiles essentielles par les méthodes chromatographiques est relativement récente. En effet, la *chromatographie sur papier*, introduite en 1944 par CONSDEN, GORDON et MARTIN **(88)**, est difficilement applicable aux substances lipophiles telles que les essences ; comme l'ont montré PARIS et GODON **(89)** en particulier, l'application de la chromatographie sur papier aux essences nécessite l'emploi de papiers hydrofugés et, pour la révélation, la mercuration préalable des essences. A cette technique complexe, nous avons préféré deux méthodes chromatographiques plus récentes, les chromatographies sur couche mince et en phase gazeuse, dont les essences ont constitué une des premières et probablement aussi une des meilleures applications.

Chromatographie sur couche mince.

Cette méthode analytique est devenue d'un usage tellement courant que nous n'insisterons pas sur son principe. L'adsorption et l'élution des substances se font comme pour une colonne de chromatographie, mais l'adsorbant est appliqué en couche mince sur une plaque de verre (d'où le nom de « chromatoplaque »). Le mélange à analyser est déposé au bas de la plaque, puis la révélation et la mesure des R_F se font comme en chromatographie sur papier.

La chromatographie sur couche mince est due à KIRCHNER, MILLER et KELLER **(90)** (1951) qui l'ont décrite sous le nom de « chromatostrip », parce que ces auteurs utilisaient des bandes de

APPAREIL A ENTRAINEMENT A LA VAPEUR D'EAU
DES ESSENCES
(appareil de STAHL légèrement modifié)

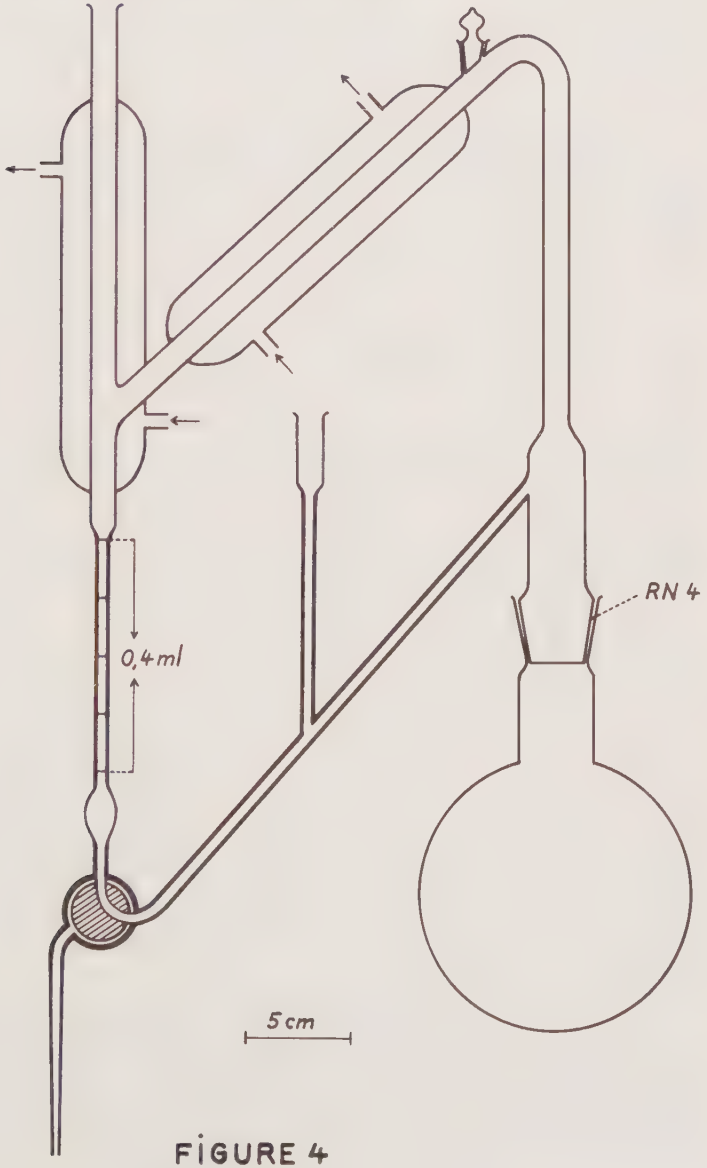


FIGURE 4

verre étroites. C'est REITSEMA **(91)** (1954) qui préconise l'emploi de plaques de verre plus larges, ce qui permet le cheminement parallèle de substances témoins. Par la suite, de nombreux auteurs dont DEMOLE **(92)** en particulier, se sont attachés à perfectionner la méthode surtout en vue d'obtenir une couche d'adsorbant uniforme. Les ouvrages récents de STAHL **(93)** et RANDERATH **(94)** font le point des applications possibles de la chromatographie sur couche mince.

Par rapport à la chromatographie sur papier, les *avantages* de la méthode sont : le temps d'élution généralement très court (souvent moins d'une heure), la possibilité de l'appliquer aux substances lipophiles telles que les essences et l'utilisation possible des révélateurs les plus énergiques (l'acide sulfurique en particulier). Les *inconvénients* sont : la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles par suite des nombreux facteurs qui interviennent (épaisseur et degré d'activation de l'adsorbant, température et degré de saturation de la cuve, etc.), le manque de précision dans la mesure des R_F par suite des distances de cheminement assez courtes (10 à 20 cm), l'impossibilité de conserver les chromatoplaques révélées. Actuellement on peut disposer d'appareils perfectionnés qui permettent d'éliminer, en grande partie, l'influence des différents facteurs. Cependant, malgré les progrès réalisés, un R_F sur chromatoplaque reste moins précis qu'un R_F en chromatographie sur papier. C'est pourquoi, on préfère généralement déterminer les R_F relatifs, plus constants, par rapport à une substance de référence.

Pour l'étude taxonomique des essences d'*Hypericum*, il s'agit avant tout de comparer les constituants des essences entre eux et avec des témoins connus. Il n'est donc pas indispensable de rechercher une grande précision sur le R_F absolu des substances. En opérant la comparaison sur une chromatoplaque, même préparée sans dispositif spécial, les substances qui cheminent parallèlement se trouvent pratiquement dans les mêmes conditions (on a intérêt à laisser une marge de 2 cm des deux côtés de la plaque pour éviter les effets de bords).

Par contre, il est très important d'éluer les chromatoplaques avec le solvant qui provoque l'étalement maximum des taches dues aux constituants. L'élution des chromatoplaques se fait comme celle d'une colonne de chromatographie, avec des solvants de plus en plus polaires. Les carbures, saturés ou terpéniques, élués même avec les solvants les moins polaires (hexane), présentent des R_F élevés, ce qui rend leur séparation très difficile ou même impossible. Nous avons considérablement amélioré la ***séparation des terpènes liquides***

en effectuant le développement des chromatoplaques *à basse température* (- 15°) ; on diminue ainsi la vitesse de cheminement du solvant et simultanément on obtient un abaissement notable des R_F. Exceptionnellement, nous avons également utilisé des chromatoplaques, préparées avec de la *silice au nitrate d'argent*, technique préconisée très récemment par BARRETT, DALLAS et PADLEY **(95)** (1962). Cette dernière méthode présente l'avantage de pouvoir se faire à température ordinaire et de donner des séparations très nettes ; il faut même ajouter à l'hexane un solvant plus polaire (acétate d'éthyle p.ex.) pour faire migrer les terpènes les plus polaires. Ses inconvénients sont les traînées pour les spots à R_F bas et le noircissement rapide des plaques qui doivent être préparées peu avant leur emploi.

Pour l'étude des terpènes par la chromatographie en couche mince, la meilleure solution consiste, à notre avis, à opérer couramment à - 15°, ce qui donne, avec un seul éluant, un aperçu suffisant de la composition des essences en terpènes (spots étalés de R_F = 0,25 à R_F = 0,85) ; on réserve les plaques au nitrate d'argent pour la comparaison d'un sesquiterpène précis avec une substance témoin, en utilisant un solvant de polarité telle que la substance étudiée présente un R_F compris entre 0,30 et 0,70 où la comparaison est la meilleure.

Pour les *composés oxygénés des essences*, nous avons utilisé les méthodes classiques, largement décrites dans l'ouvrage de STAHL **(93)** .

La *révélation* des constituants des essences avec des révélateurs variés augmente les points de comparaison avec des substances connues et permet souvent leur identification.

Chromatographie fonctionnelle sur couche mince.

En chromatographie sur couche mince, l'obtention de spots de mêmes R_F sur la même plaque est une condition nécessaire, mais non suffisante, de l'identité de deux produits. Pour augmenter la conviction lors de telles comparaisons, il est courant de les multiplier sur des dérivés de ces produits ; p.ex., s'il s'agit d'alcools, on compare également les acétates, les dinitrobenzoates, etc.. Déjà en 1953, MILLER et KIRCHNER **(96)** ont montré qu'il était possible de réaliser certaines transformations chimiques directement sur la substance déposée au point d'application de la chromatoplaque. Cette méthode qui n'a guère été mentionnée depuis, présente plusieurs inconvénients : l'impossibilité d'utiliser une réaction un peu lente ; l'élution centrifuge du premier produit déposé sur la plaque par la solution du second, ce qui conduit nécessairement à un mélange et à une réaction incomplets.

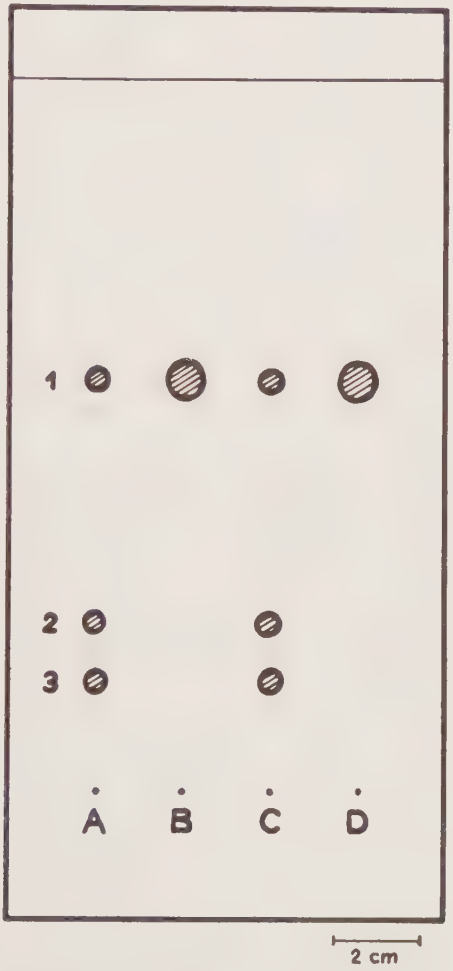
Pour éviter les inconvénients de la méthode de MILLER et KIRCHNER, nous avons réalisé les réactions dans le tube capillaire servant à déposer la solution sur la chromatoplaque (voir partie expérimentale). De cette façon, on peut laisser en contact le produit à identifier et le réactif pendant la durée voulue: le solvant, même volatil, s'évapore peu d'un capillaire; on peut même chauffer le capillaire en scellant les deux extrémités. Le mélange réactionnel est ensuite appliqué directement sur la plaque.

Dans ces conditions, nous avons pu obtenir l'acétylation complète d'alcools monoterpéniques et l'époxydation complète des carbures terpéniques. La méthode mise au point peut s'appliquer aux réactions les plus diverses, à condition toutefois que le réactif utilisé soit en solution et qu'il ne donne pas de produit de décomposition interférant avec la chromatographie. Les principales applications que nous avons faites de cette technique sont : l'époxydation des doubles liaisons par l'acide paranitroperbenzoïque, l'oxydation des alcools par l'acide chromique, la réduction des aldéhydes par les hydrures mixtes, la saponification des esters par la potasse, l'acétylation des alcools par l'anhydride acétique et la pyridine, la déshydratation des alcools tertiaires par l'acide sulfurique concentré ou le mélange oxychlorure de phosphore-pyridine, la formation de 2,4-dinitrophénylhydrazones.

Lorsque la chromatographie fonctionnelle sur couche mince est utilisée pour des substances connues, on traite un témoin dans les mêmes conditions; la comparaison avec la substance témoin est d'autant plus probante que les produits formés dans la réaction et séparés sur la chromatoplaque sont plus nombreux. Par exemple, ayant à identifier dans une essence une fraction paraissant identique à l'α-terpinéol, nous avons déposé sur une plaque (figure 5) de l'α-terpinéol pur (taches A et B) et le produit à identifier (taches C et D); sur les taches A et C, nous avons déposé une solution d'acide *p*-nitroperbenzoïque à 10 % dans le chloroforme **(97)** ; après quelques minutes, nous avons élué par le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1. Dans ces conditions, l'α-terpinéol donne deux spots nouveaux dus à des époxydes (d'après leur polarité), bien séparés par la chromatoplaque. On renforce donc considérablement la présomption d'identité du produit, d'abord par la coïncidence des R_F des époxydes et, d'autre part, par celle de leurs colorations avec divers révélateurs.

Dans le cas d'un produit inconnu, la méthode permet d'effectuer, sur des quantités minimes, des essais de réactions caractéristiques d'un groupement fonctionnel; on vérifie la présence du groupe fonctionnel suspecté par la variation de la polarité et l'apparition de

Epoxydation par l'acide p-nitroperbenzoïque



1 α-terpinéol
2 et 3 époxydes de l'α-terpinéol

FIGURE 5

taches nouvelles sur la plaque.

Le postulat énoncé par MARTIN **(98)** peut sembler une objection sérieuse à la chromatographie fonctionnelle sur couche mince. En effet, selon ce postulat, le R_M d'une substance [$R_M = \log(\frac{1}{R_F} - 1)$] est égal à la somme des R_M de ses groupements fonctionnels plus une constante pour le système solvant; ce qui revient à dire que deux substances ayant les mêmes R_F forment des dérivés ayant également les mêmes R_F et que la formation de dérivés n'ajoute rien à la caractérisation.

Il n'est pas dans notre intention de discuter le postulat de MARTIN, maintes fois vérifié en chromatographies sur papier et sur couche mince. Nous voudrions montrer simplement qu'en pratique, ce postulat ne diminue nullement l'intérêt de la méthode que nous préconisons; dans l'analyse fonctionnelle sur chromatoplaque, deux substances à mêmes R_F se différencieront au moins par leurs différences de réactivité vis-à-vis des réactifs utilisés ou par les colorations de leurs dérivés, traités par divers révélateurs. Par exemple, le géraniol (2 doubles liaisons) et le citronnellol (1 double liaison), à R_F très voisins, se sépareront facilement par époxydation, le premier formant un dioxyde, le deuxième un monoxyde à R_F nettement différents; le géraniol et l'α-terpinéol, difficiles à distinguer par leurs R_F, se différencient nettement par l'acétylation pyridinée qui laisse intact l'α-terpinéol ou la déshydratation par le mélange $POCl_3$-pyridine qui ne touche pas le géraniol.

Ces exemples montrent que le postulat de MARTIN n'enlève rien à la valeur de la chromatographie fonctionnelle sur couche mince. Cette méthode permet, par ses nombreuses possibilités d'application, d'identifier les constituants des essences, surtout jointe aux autres méthodes analytiques que nous décrivons.

Chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie gazeuse diffère des autres méthodes chromatographiques par l'emploi d'un gaz comme phase mobile. Déjà en 1941, MARTIN et SYNGE **(99)** avaient suggéré d'utiliser un gaz comme phase mobile; mais il faut attendre les travaux de CREMER, MULLER et PRIOR **(100)** (1951) pour la chromatographie gaz - solide et ceux de JAMES et MARTIN **(101)** (1952) pour la chromatographie gaz-liquide, pour que cette technique trouve ses premières applications pratiques. La chromatographie gaz-solide, basée sur l'adsorption des gaz par les solides, n'est pratiquement utilisée que pour les gaz. Au cours de notre travail, nous nous servirons uniquement de la chromatographie gaz-liquide qui est une chromatographie

de partage entre la phase gazeuse mobile et la phase liquide stationnaire.

La chromatographie gazeuse constitue la méthode de choix pour l'étude des constituants volatils de la plante ; elle est à la fois la méthode la plus sensible pour une étude de la composition qualitative des essences et la plus précise pour une étude quantitative. On trouve, dans le traité de BURCHFIELD et STORRS **(102)** (1962), les résultats obtenus jusqu'à présent dans la séparation des constituants des essences par la chromatographie gazeuse. Nous voudrions cependant rappeler les principaux travaux concernant les monoterpènes et leurs dérivés oxygénés : LIBERTI et CARTONI **(103)** (1958, 1960), ZUBYK et CONNER **(104)** (1960), KLOUWEN et HEIDE **(105)** (1962).

La *phase stationnaire*, utilisée en chromatographie gazeuse, est toujours constituée par un liquide peu volatil, imprégnant très régulièrement un support solide, inerte, en grains poreux, de diamètre bien défini ; à chaque phase stationnaire, correspond une température maximum d'utilisation au-dessus de laquelle elle commence à se volatiliser ou à se décomposer. On distingue deux types de phases stationnaires : les unes, type polyéthylèneglycol, sont polaires et séparent les constituants des essences avant tout d'après leur polarité ; les colonnes non-polaires, type silicone, séparent les substances d'après leur point d'ébullition, ce qui permet de connaître, par comparaison, le point d'ébullition approximatif d'une substance inconnue. On connait tous les intermédiaires entre ces deux types extrêmes de phases stationnaires.

La *détection* des substances, sortant de la colonne de chromatographie gazeuse, peut se faire par différentes méthodes sur lesquelles nous reviendrons. Dans tous les cas, la réponse du détecteur est amplifiée et enregistrée sur un papier qui se déroule régulièrement. On obtient ainsi des chromatogrammes avec des « pics » plus ou moins intenses suivant la quantité de chaque substance du mélange analysé. Avec une phase stationnaire adéquate, on obtient un pic séparé pour chaque substance dont on définit la position sur le chromatogramme par son temps de rétention, proportionnel à la distance de déroulement du papier enregistreur.

Nos chromatogrammes ont été obtenus principalement sur un chromatographe avec *détecteur à ionisation de flamme* (Aerograph Hy-FI). Ce détecteur est constitué par un brûleur, alimenté par de l'hydrogène, qui produit des ions à partir des substances organiques sortant de la colonne chromatographique ; les ions engendrent des modifications de la conductivité de la flamme qu'on peut enregistrer.

Les avantages de ce mode de détection sont : sa grande sensibilité ; son inertie pour l'eau et le sulfure de carbone, ce qui permet de diluer le produit étudié dans l'un de ces solvants. Ses principaux inconvénients sont : la longueur souvent insuffisante des colonnes ; l'utilisation comme gaz vecteur de l'azote qui ne donne pas, comme l'hydrogène, une détection linéaire en fonction de la quantité de substance injectée, d'où des résultats quantitatifs moins précis.

C'est pourquoi, nous avons également étudié un certain nombre d'essences sur un appareil avec *détecteur à conductibilité thermique,* à colonnes plus longues et utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur (Fractomètre 116, Perkin-Elmer). Ce détecteur est basé sur la modification de la conductibilité thermique d'un filament en platine par les substances sortant de la colonne.

Par suite de la composition complexe des essences, il n'est pas possible d'obtenir à température fixe un chromatogramme avec des pics convenables pour tous les constituants. Dans le but de pallier cet inconvénient, nous avons passé quelques essences sur un *appareil à programmation de température* où les premiers composants sortent à 60° et les derniers au-dessus de 200° (figure 6). Dans le cas des essences d'*Hypericum,* la programmation nous a permis d'évaluer le rapport entre les fractions mono- et sesquiterpéniques, à points d'ébullition nettement distincts.

En vue d'identifier les composants d'une essence inconnue par comparaison avec des substances témoins, nous avons comparé les temps de rétention sur au moins deux phases stationnaires, l'une polaire, l'autre non-polaire. Comme les temps de rétention en valeur absolue sont très variables avec les conditions expérimentales, nous avons toujours utilisé les temps de rétention relatifs par rapport à une substance de référence (voir tableau 12, partie expérimentale).

Pour l'analyse quantitative des essences, nous nous sommes servi des résultats fournis par l'intégrateur sur l'Aerograph Hy-F I. Pour les chromatogrammes obtenus sur le Perkin-Elmer, nous avons calculé la surface des pics par le produit (hauteur du pic × largeur à mi-hauteur), en tenant compte de l'interférence des pics. Les résultats ainsi obtenus sont seulement approximatifs, mais suffisamment précis pour une étude chimio-taxonomique comparative.

Chromatographie gazeuse de substances isolées sur chromatoplaques.

Dans certains cas, nous avons procédé à une chromatographie sur couche mince préparative pour isoler quelques milligrammes d'un constituant qu'on étudie ensuite en chromatographie gazeuse sur plusieurs phases stationnaires.

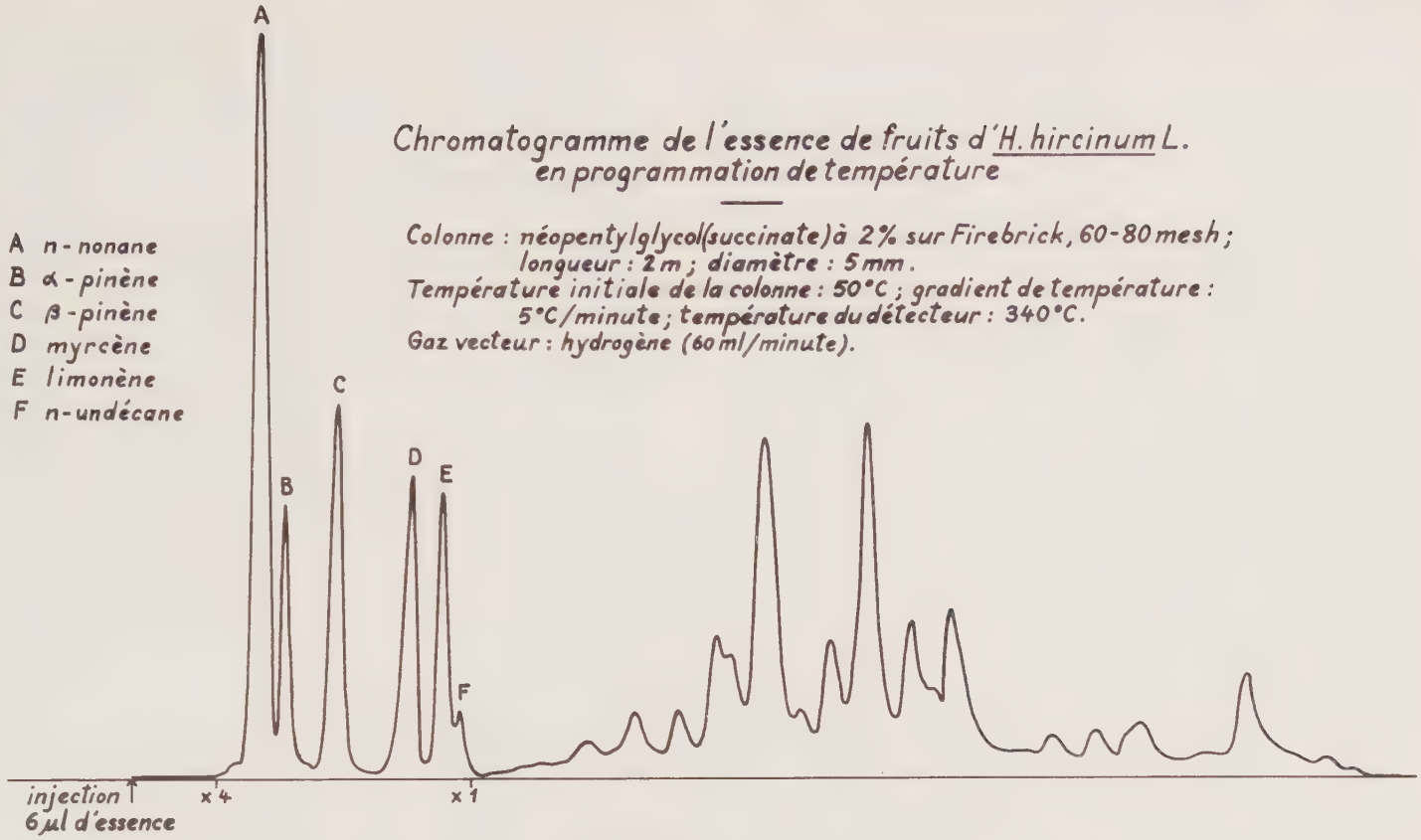

Chromatogramme de l'essence de fruits d'H. hircinum L.
en programmation de température
Colonne : néopentylglycol(succinate) à 2% sur Firebrick, 60-80 mesh ;
longueur : 2 m ; diamètre : 5 mm.
Température initiale de la colonne : 50°C ; gradient de température :
5°C/minute ; température du détecteur : 340°C.
Gaz vecteur : hydrogène (60 ml/minute).
A n-nonane
B α-pinène
C β-pinène
D myrcène
E limonène
F n-undécane
A
B
C
D
E
F
injection
6 µl d'essence
x 4
x 1

FIGURE 6

Cette méthode permet d'éviter les inconvénients de la chromatographie gazeuse ou sur couche mince, prise isolément, et de cumuler, au contraire, les avantages des deux techniques :

1° Elle permet l'analyse fonctionnelle des pics, observés en chromatographie gazeuse, et souvent même leur identification. Prenons le cas d'une essence présentant sur chromatoplaque un spot qui, d'après sa polarité, est un alcool ; comme ce spot se révèle en rose, puis en vert avec le chlorure d'antimoine, il s'agit d'un alcool monoterpénique. Extraite des plaques, cette substance présente, en chromatographie gazeuse sur plusieurs phases stationnaires, les temps de rétention du géraniol, ce qui permet de la distinguer des autres alcools monoterpéniques en choisissant des phases stationnaires adéquates.

2° Grâce à cette technique, on peut faire la relation entre les pics observés sur deux phases stationnaires, relation souvent difficile à réaliser directement sur des mélanges aussi complexes que les essences.

3° La méthode permet également la «révélation» et l'identification par leurs temps de rétention en chromatographie gazeuse des carbures saturés, non révélables sur chromatoplaques et migrant toujours sur le front du solvant.

Identification des carbures saturés par bromation des essences.

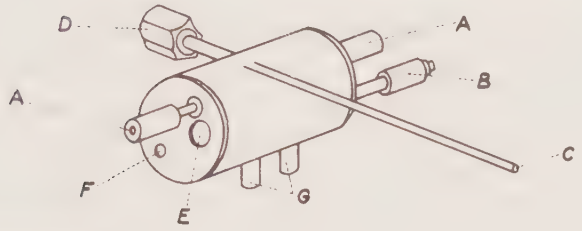
Le brome, agissant sur une essence, se fixe sur tous les constituants à doubles liaisons et laisse seulement intacts les carbures saturés. L'étude, en chromatographie gazeuse, de l'essence bromée permet ensuite l'identification des carbures saturés par leurs temps de rétention sur colonne non-polaire.

Chromatographie gazeuse «directe» sur les échantillons de plantes.

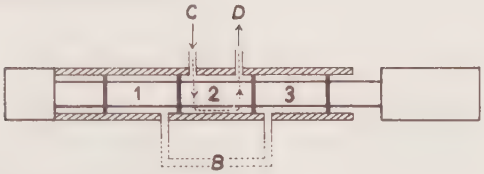
Pour certains problèmes taxonomiques, il n'est pas toujours possible d'effectuer sur un échantillon d'une espèce, un ou plusieurs entraînements à la vapeur d'eau en vue d'isoler l'essence. C'est pourquoi, nous avons mis au point un appareil adaptable sur un chromatographe qui permet d'obtenir un chromatogramme des substances volatiles directement sur un petit échantillon de plante.

La chromatographie gazeuse «directe», sans isolement préalable de l'essence, par pyrolyse de fragments de plante, a été réalisée au moyen du four représenté par la figure 7. Après chauffage de l'échantillon de plante dans l'enceinte close du four, on balaie les principes volatils par le gaz vecteur dont le temps de passage est

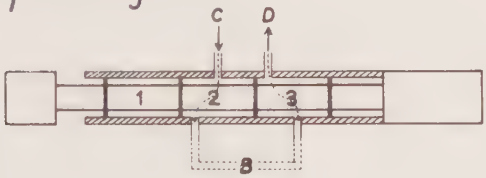
FOUR A PYROLYSE ET VALVE REGLABLE
POUR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE



A *position normale*



A *position injection*



A. Valve à 2 positions.

B. Four à pyrolyse avec cupule pour l'échantillon et joint en silicone.

C. Entrée du gaz vecteur.

D. Sortie du gaz vecteur vers le chromatographe.

E. Cavité pour résistance chauffante du four.

F. Conduit pour thermocouple.

G. Ouvertures pour le nettoyage des conduits.

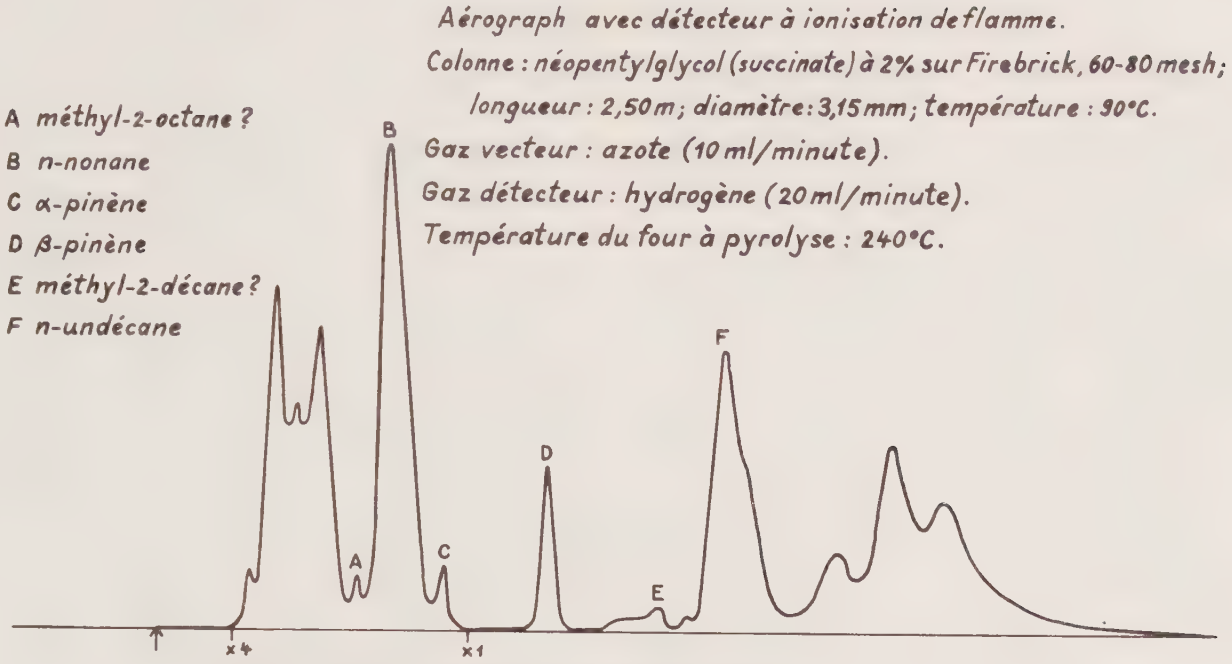
FIGURE 7

réglable à l'aide d'une valve. Après avoir chauffé un échantillon de l'ordre du décigramme (feuille, fleur ou fruit d'*Hypericum*) pendant 1 minute à 240°, nous avons pu détecter avec certitude tous les composants volatils jusqu'au *n*-undécane inclus (Eb $_{760}$: 195°).

Les chromatogrammes ainsi obtenus (figure 8) présentent toujours des pics supplémentaires, dus sans doute à des produits de pyrolyse ou à des produits exclus de l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur d'eau. Par suite de la complexité des courbes, il n'est pas possible d'utiliser cette méthode sous sa forme actuelle pour l'étude d'une espèce inconnue. Par contre, comme nous le verrons plus loin, nous avons pu, grâce à cette méthode, étudier les variations de la teneur en essence et de sa composition qualitative d'une part suivant les organes de la plante, d'autre part chez des plants hybrides.

Grâce à ces microméthodes analytiques, appliquées de nombreuses fois et dans des conditions variées, nous avons pu entreprendre une étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* par les essences, même pour des espèces dont nous n'avions que quelques plants (10 à 20 g de matière première p.ex.).

Chromatogramme obtenu directement sur la plante



Tige feuillée d'*Hypericum nummularium* L.

FIGURE 8

CHAPITRE IV

IDENTIFICATION DE CONSTITUANTS DES ESSENCES D'HYPERICUM

Travaux antérieurs

Peu de travaux ont été faits jusqu'ici concernant les essences d'*Hypericum*. En 1905, HAENSEL **(106)** recueille l'essence d'*H.perforatum* L. par entraînement à la vapeur d'eau et en détermine quelques constantes physiques. Par la suite, divers auteurs dosent l'essence de cette même espèce et signalent, en général, des rendements de l'ordre de 1 à 2 g par kg de plante fraîche. En 1952, ROTH **(85)** dose les essences d'une vingtaine d'espèces d'*Hypericum* à l'aide de l'appareil de STAHL.

Les premières recherches concernant la composition de l'essence d'*H.perforatum* L. sont dues à ZELLNER et PORODKO **(107)** (1925); ces auteurs montrent la présence probable d'α-pinène et postulent celle de quelques sesquiterpènes (par des réactions colorées) et d'un ester isovalérianique (par son odeur). MILLER **(108)** (1927) confirme d'ailleurs la présence de l'α-pinène par l'obtention de son nitrosochlorure cristallisé. En 1933, BOGERT et MARION **(109)** isolent le *n*-nonane de *Sarothra gentianoides* L., Hypéricacée américaine actuellement rattachée au genre *Hypericum* sous le nom d'*H.sarothra* Michx. Enfin, très récemment, SALGUES **(60)** (1961) a mis en évidence la présence des aldéhydes saturés linéaires en C_{10} et C_{12} dans les essences de racines d'espèces européennes d'*Hypericum*.

Isolement et fractionnement des essences d'Hypericum

Toutes les essences d'*Hypericum* ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes fraîches, parfois des feuilles, des fleurs ou des fruits. Le tableau 13 (partie expérimentale) groupe tous les résultats de l'entraînement à la vapeur d'eau et met en évidence les faibles rendements en essence (en général, moins de 1 g par kg de plante fraîche). Une distillation fractionnée n'a été

FRACTION VOLATILE DE L'ESSENCE

d'Hypericum perforatum L.

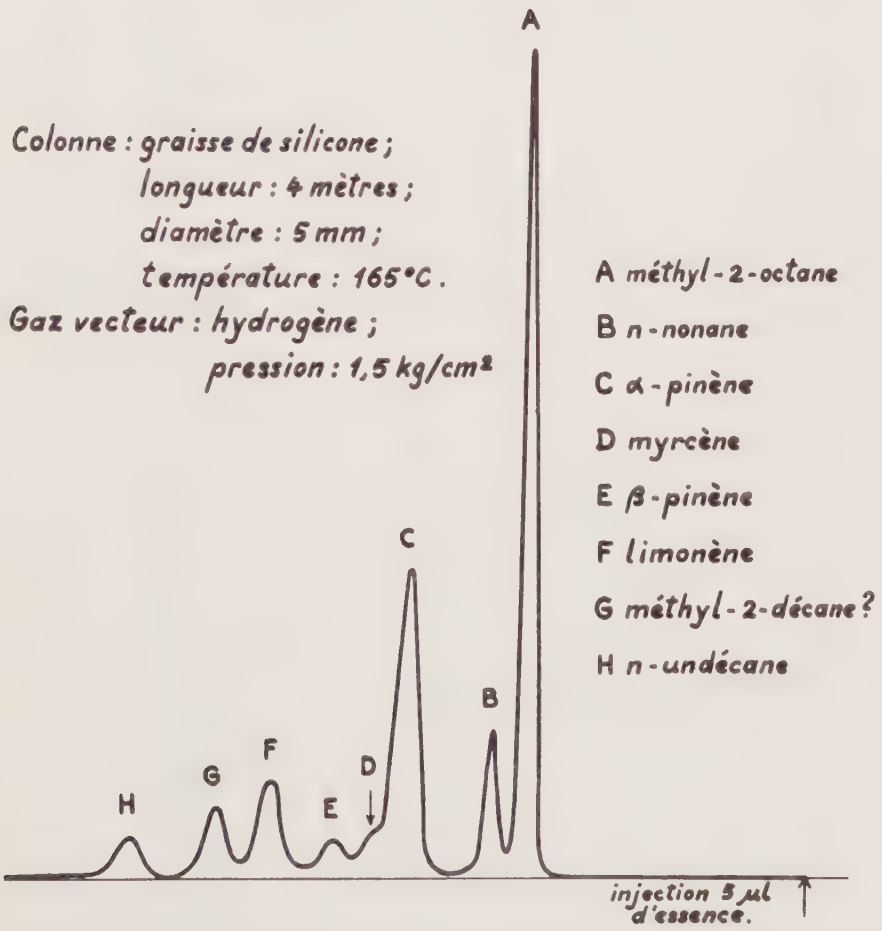


FIGURE 9

possible que sur trois espèces qui ont fourni plus de 10 g d'essence : *H. perforatum* L., *H. hirsutum* L. et *H. calycinum* L.. Les fractions de ces trois essences (voir partie expérimentale) nous ont servi à l'identification des constituants ; les chromatogrammes des figures 9 et 10 mettent en évidence leurs principaux constituants.

Identification de constituants des essences d'Hypericum

Méthyl-2-octane : $(CH_3)_2$ CH-$(CH_2)_5$-CH_3.

Les fractions de tête de l'essence d'*H. perforatum* L. (Eb $_{760}$: 140°-145°) contiennent un composé nettement prédominant, d'après la chromatographie gazeuse ; leur spectre I.R. révèle quelques faibles bandes attribuables à des impuretés éthyléniques, mais autrement est celui d'un carbure saturé. Nous avons donc éliminé tous les composés non-saturés par ozonisation (méthode de CONIA et LERIVEREND **(110)**), puis chromatographie sur silice. Le produit obtenu est un mélange de deux hydrocarbures saturés dont le moins abondant (2-3 %) est le *n*-nonane (voir plus bas). Le produit majeur a été identifié comme étant le méthyl-2-octane pour les raisons suivantes :

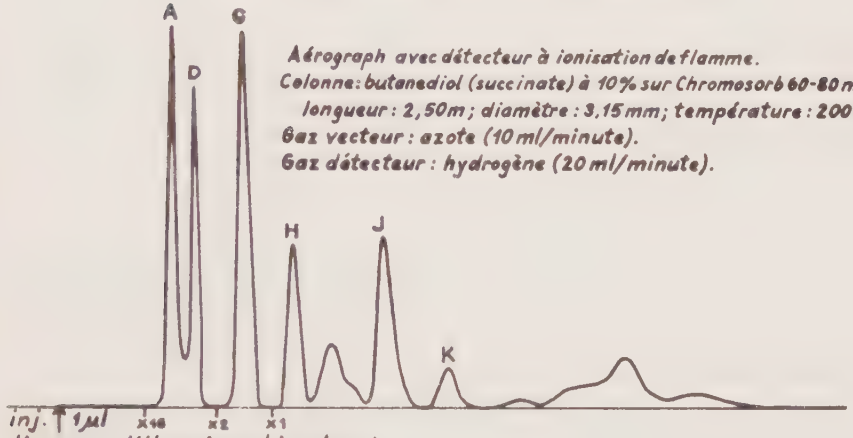
- Son *point d'ébullition,* intermédiaire entre celui du *n*-nonane (150°) et celui du *n*-octane (125°), est compris entre 140° et 145° (litt.**(111)** 143°).
- Son *spectre de R.M.N.* présente un pic large, centré à 75 cps de tétraméthylsilane (groupes CH et CH_2) et un doublet dissymétrique à 49 et 55 cps (groupes CH_3) ; l'intensité relative des deux groupes de pics implique un rapport très voisin de 11 protons dans les groupes CH et CH_2, pour 9 dans les groupes CH_3. Le fait que l'on distingue parfaitement un doublet (J = 6 cps) correspondant à deux groupes méthyles confirme la présence du groupe isopropyle ; le troisième groupe méthyle donne un signal complexe, caché sous l'une des composantes de ce doublet.
- Son *spectre infra-rouge* révèle un groupe gem-diméthyle (1370-1380 cm^{-1}). D'autre part, il est identique en tous points à celui du méthyl-2-octane reproduit dans la cartothèque DMS **(112)** ; il est très différent de ceux des isomères également reproduits dans cette cartothèque, ce qui tranche la question.
- Le méthyl-2-octane que nous avons préparé par synthèse, présente les mêmes spectres I.R. et R.M.N..

A notre connaissance, c'est la première fois que le méthyl-2-octane a été isolé dans le règne végétal.

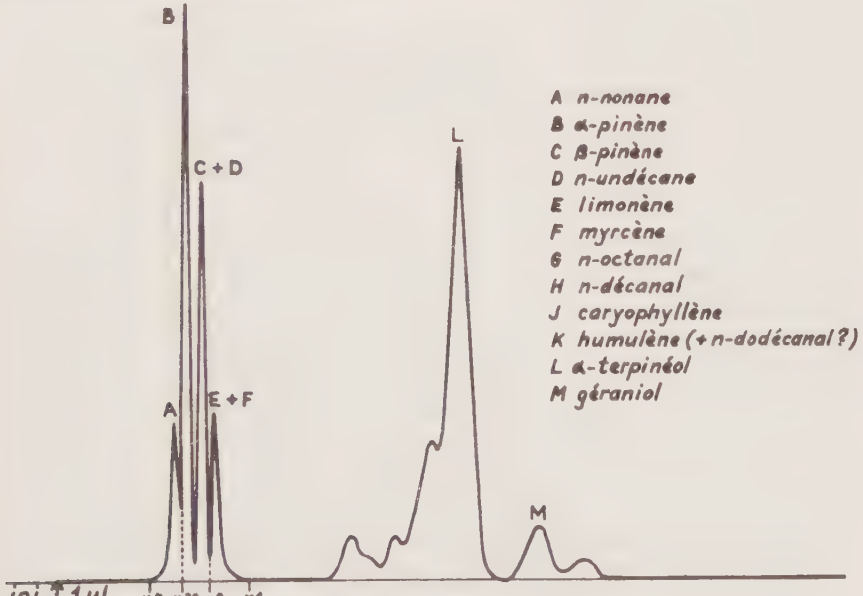
Méthyl-2-décane : $(CH_3)_2$ CH-$(CH_2)_7$-CH_3.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la bromation

Chromatogrammes d'essences d'Hypericum



d'essence d'Hypericum hirsutum L.



d'essence d'Hypericum calycinum L. (fruits)

FIGURE 10

d'une essence fait disparaître tous les pics, en chromatographie gazeuse, sauf ceux dus à des carbures saturés.

Avec l'essence d'*H. olympicum* L., ce traitement laisse subsister quatre pics dont trois sont identifiés : méthyl-2-octane, *n*-nonane, *n*-undécane. Le quatrième pic présente, sur plusieurs phases stationnaires, les mêmes temps de rétention que le méthyl-2-décane (Eb = 190°) que nous avons obtenu par synthèse ; il ne peut donc être dû à un éthylnonane, un diméthylnonane, etc., à points d'ébullition nettement plus bas, donc à temps de rétention plus faibles sur colonne peu polaire : par contre, on ne peut distinguer entre eux les méthyldécanes, à points d'ébullition très voisins (méthyl-3-décane 191° ; méthyl-4-décane 187°)**(113)** .

C'est seulement par analogie avec le méthyl-2-octane que nous supposons que le méthyldécane identifié est le méthyl-2-décane. Il n'a pas été possible d'en isoler des quantités suffisantes pour confirmer cette présomption.

N.B. Nous avons préparé le méthyl-2-octane et le méthyl-2-décane à partir de la méthylhexylcétone (n = 4) et de la méthyloctylcétone (n = 6) respectivement :

$$CH_3\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_n\text{-}CH_3 \xrightarrow{CH_3\text{-}MgI} (CH_3)_2\,C(OH)\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_n\text{-}CH_3$$

$$\downarrow POCl_3\text{-pyridine}$$

$$(CH_3)_2\,CH\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_n\text{-}CH_3 \xleftarrow{H_2(+PtO_2)} (CH_3)_2\,C = CH\text{-}(CH_2)_n\text{-}CH_3$$

n-Nonane : $CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH_3$.

La première fraction de distillation de l'essence d'*H. hirsutum* L., chromatographiée sur silice, a fourni le *n*-nonane à plus de 90 % de pureté chromatographique (l'impureté étant le *n*-undécane : voir plus bas). Ce *n*-nonane a été identifié par les critères suivants :

- Son *point d'ébullition* est de 38° sous 15 mm Hg (littérature**(114)**: Eb_{11} : 39,5°).
- Son *spectre de R.M.N.* montre, comme pour tous les carbures linéaires, deux massifs, l'un dû aux groupes méthylènes de la chaîne (centré à 75 cps), l'autre qui culmine à 54 cps et qui est très caractéristique du multiplet dissymétrique des méthyles terminaux des chaînes aliphatiques normales **(115)**. Leur intensité relative est de 14 à 6 environ, ce qui correspond bien au rapport des protons des CH_2 aux protons des groupes CH_3.
- Son *spectre infra-rouge*, à bande (CH_3) symétrique faible, unique, est identique à celui du *n*-nonane authentique ; il est vrai que ce critère n'a que peu de valeur à lui seul, puisque les autres hydrocarbures linéaires de complexité voisine s'en distinguent mal.

n-Undécane : $CH_3\text{-}(CH_2)_9\text{-}CH_3$.

La seconde fraction de distillation de l'essence d'*H. hirsutum* L., chromatographiée sur silice, est constituée de *n*-undécane, à plus de 90 % de pureté chromatographique (l'impureté étant le *n*-nonane). Cet hydrocarbure a été identifié par les mêmes critères que le *n*-nonane :

- Eb_{15} : 74° (litt. **(114)**: Eb_{15} : 81°).
- Spectre R.M.N. : intensité relative des deux bandes : 18 à 6.
- Spectre I.R. : identique à celui du *n*-undécane authentique.

α - *et* - β *pinènes :* $C_{10}H_{16}$ (tableau 5, formules V et VI).

La distillation de l'essence d'*H.calycinum* L. a fourni des fractions dont certaines correspondaient à des produits presque purs en chromatographie gazeuse.

L'une des fractions a montré un spectre I.R. rigoureusement identique à celui de l'α pinène de référence. Le comportement de ce produit en chromatographie gazeuse, avec diverses phases stationnaires, et en chromatographie sur couche mince, avec adsorbant chargé ou non de nitrate d'argent **(95)**, renforce cette conclusion. La chromatographie sur couche mince, avec époxydation directe sur la plaque par l'acide *p*-nitroperbenzoïque **(97)**, fournit, comme avec l'α-pinène, un spot d'époxyde caractéristique. Il s'agit du (+)- α - pinène : $[\alpha]_D = + 45°$ (litt. **(116)**: + 51°).

Une autre fraction de la même distillation contient plus de 95 % de β -pinène. Comme l'α-pinène, le β -pinène a été caractérisé en chromatographie gazeuse et sur couche mince. Son spectre I.R., très caractéristique par suite des bandes intenses dues au groupe méthylène, est identique à celui du β -pinène de référence. De plus, l'ozonisation suivant la méthode de CONIA et LERIVEREND **(110)** donne la nopinone, facilement identifiable par son spectre I.R. et sa dinitro-2,4-phénylhydrazone, à point de fusion et à spectre U.V. caractéristiques. Il s'agit du (-) β -pinène : $[\alpha]_D = - 18°$ (litt.**(117)**: - 23°).

N.B. L'essence d'*H.perforatum* L. contient également le (+)- α - pinène.

Limonène : $C_{10}H_{16}$ (tableau 5, formule IV).

La fraction résiduelle de l'essence d'*H.calycinum* L. a été chromatographiée sur alumine ; en éluant à l'éther de pétrole, on obtient une fraction à odeur de citron qui est rechromatographiée sur silice chargée de nitrate d'argent **(87)** ; on recueille du limonène à 95 % de pureté (d'après la chromatographie gazeuse). Le limonène a été identifié, par comparaison avec le produit pur, d'après

- son spectre infra-rouge très révélateur.
- son R_F sur chromatoplaque avec ou sans nitrate d'argent.
- le R_F de son époxyde sur chromatoplaque.
- ses temps de rétention sur plusieurs colonnes en chromatographie gazeuse.

Il s'agit du (+) limonène qui correspond, en stéréochimie absolue, au (+)- α -pinène **(118)** (trouvé : $[\alpha]_D$ = + 102° ; litt. **(117)** : + 125°).

Myrcène : $C_{10}H_{16}$ (tableau 5, formule III).

Constituant mineur des essences d'*Hypericum* étudiées, le myrcène n'a pu être caractérisé que par des méthodes analytiques, par comparaison avec le myrcène pur :

- Son comportement en chromatographie sur couche mince (R_F et révélation avec le chlorure d'antimoine) montre qu'il s'agit d'un monoterpène à trois doubles liaisons (voir tableau 11).
- En chromatographie gazeuse, ses temps de rétention sur plusieurs phases stationnaires sont les mêmes que ceux du myrcène pur ; ce caractère est probablement suffisant pour le différencier des autres monoterpènes acycliques, puisque l'allo-ocimène p.ex. donne des temps de rétention nettement différents.
- L'étude en chromatographie gazeuse du myrcène extrait des chromatoplaques renforce les conclusions précédentes.
- L'époxydation du myrcène pur par l'acide *p*-nitroperbenzoïque, directement sur la chromatoplaque, fournit un spot d'époxyde qu'on observe également avec les essences d'*Hypericum*, suffisamment riches en myrcène et traitées dans les mêmes conditions.

En dehors de ces arguments, suffisants à notre avis, pour conclure à la présence de myrcène, il est intéressant de noter que les essences d'*Hypericum* les plus riches en myrcène sont souvent aussi riches en limonène ; or on sait que le myrcène se cyclise facilement en limonène.

Caryophyllène : $C_{15}H_{24}$ (tableau 5, formule VII).

Les fractions sesquiterpéniques complexes de l'essence d'*H.perforatum* L. renferment une petite quantité d'un sesquiterpène qui est très probablement le caryophyllène pour différentes raisons :

- Sur chromatoplaque avec ou sans nitrate d'argent, le R_F du sesquiterpène et la coloration fournie par divers révélateurs sont les mêmes que pour le caryophyllène pur.
- L'action de l'acide *p*-nitroperbenzoïque ou de l'acide perphtalique sur le caryophyllène fournit, sur chromatoplaque, deux spots d'épo-

xydes qu'on retrouve également sur les fractions sesquiterpéniques de l'essence d'*H.perforatum* L., traitées de la même façon.
- Le sesquiterpène étudié, isolé à partir de l'essence par chromatographie sur couche mince préparative, présente les temps de rétention du caryophyllène en chromatographie gazeuse.

Humulène : $C_{15}H_{24}$ (tableau 5, formule VIII).

L'humulène a été identifié dans diverses essences d'*Hypericum* (en particulier *H. quadrangulum* L.) de la façon suivante :
- Sur chromatoplaque avec ou sans nitrate d'argent, ces essences présentent un spot ayant les R_F de l'humulène et les mêmes colorations avec divers révélateurs.
- Traitée par l'acide *p*-nitroperbenzoïque, l'essence d'*H.quadrangulum* L. fournit les mêmes spots d'époxydes que l'humulène, traité dans les mêmes conditions.
- Le sesquiterpène, isolé de l'essence d'*H.quadrangulum* L. par chromatographie sur couche mince préparative, présente, en chromatographie gazeuse, les temps de rétention de l'humulène.

α- *Terpinéol :* $C_{10}H_{18}O$ (tableau 5, formule II).

Lors de la chromatographie sur alumine des fractions peu volatiles de l'essence d'*H.calycinum* L. (voir limonène), les éluats à l'éther présentent un composé nettement prédominant qui, d'après son comportement sur chromatoplaque, est un alcool monoterpénique (voir tableau 11). Par chromatographie sur silice chargée de nitrate d'argent, nous avons obtenu une fraction renfermant près de 98 % de cet alcool (l'impureté étant probablement un autre alcool monoterpénique). La comparaison avec le produit pur nous ont permis de conclure à l'α-terpinéol pour les raisons suivantes :
- Les spectres infra-rouge de l'α-terpinéol et de l'alcool étudié sont rigoureusement identiques.
- En chromatographie sur couche mince, l'alcool à identifier présente les R_F et les colorations données par l'α-terpinéol. Les modifications fonctionnelles, effectuées simultanément sur l'alcool inconnu et l'α-terpinéol, donnent des spots identiques sur chromatoplaques : mêmes monoterpènes (dont le limonène) par déshydratation par l'acide sulfurique concentré, mêmes époxydes par action de l'acide *p*-nitroperbenzoïque (voir figure 5), alcools intacts par acétylation pyridinée.
- En chromatographie en phase gazeuse, l'alcool étudié et l'α-terpinéol présentent des temps de rétention identiques sur plusieurs phases stationnaires.

Les arguments ne laissent aucun doute sur la présence de

l'α-terpinéol. Le pouvoir rotatoire trouvé ($[\alpha]_D = +20°$), correspond à un produit fortement racémisé (litt. **(119)** : + 98° pour le (+)- α-terpinéol).

Géraniol : $C_{10}H_{18}O$ (tableau 5, formule I).

Nous n'avons pu isoler l'alcool mélangé à l'α-terpinéol en petite quantité dans l'essence d'*H. calycinum* L.. Mais il s'agit certainement du géraniol d'après les résultats suivants :

- Ce corps se comporte comme un alcool monoterpénique en chromatographie sur couche mince (R_F et révélation avec le chlorure d'antimoine).
- Modifié directement sur chromatoplaque en même temps que du géraniol pur, cet alcool donne le citral par action de l'anhydride chromique, le même ester par acétylation pyridinée (l'α-terpinéol n'est pas estérifié dans ces conditions).
- En chromatographie gazeuse, l'alcool étudié présente les temps de rétention du géraniol, ce qui permet de le différencier même du nérol (voir tableau 12).

Aldéhyde caprylique ou n-octanal : $CH_3 - (CH_2)_6 - CHO$.

D'après le spectre I.R. (bande intense à 1.700 cm^{-1}), la deuxième fraction de l'essence d'*H. hirsutum* L. contient un aldéhyde saturé qui, d'après le point d'ébullition de la fraction ($Eb_{15} = 60° - 74°$) pourrait être le *n*-octanal ($Eb_{15} = 68°$). En chromatographiant sur alumine (voir *n*-undécane), les composés carbonylés se retrouvent dans les éluats éthérés qui vont servir à l'identification :

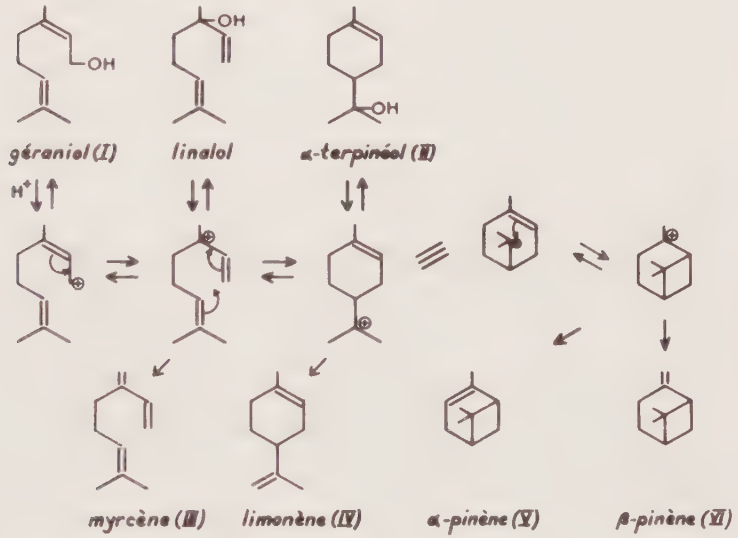
- Les aldéhydes saturés, séparés des autres composés par chromatographie sur couche mince, sont extraits à partir des plaques et étudiés en chromatographie gazeuse : les temps de rétention du pic principal sont ceux de l'aldéhyde caprylique, sur plusieurs phases stationnaires.
- La dinitro-2,4-phénylhydrazone du composé étudié et celle du *n*-octanal ont les mêmes R_F sur chromatoplaque et présentent dans l'ultra-violet la bande caractéristique des composés carbonylés saturés (λ max.=360mμ).
- La réduction par le borohydrure de sodium, effectuée en tube ou directement sur la chromatoplaque, conduit à l'alcool *n*-octylique identifiable par son comportement en chromatographie sur couche mince et en chromatographie en phase gazeuse.

Aldéhyde caprique ou n-décanal : $CH_3-(CH_2)_8-CHO$.

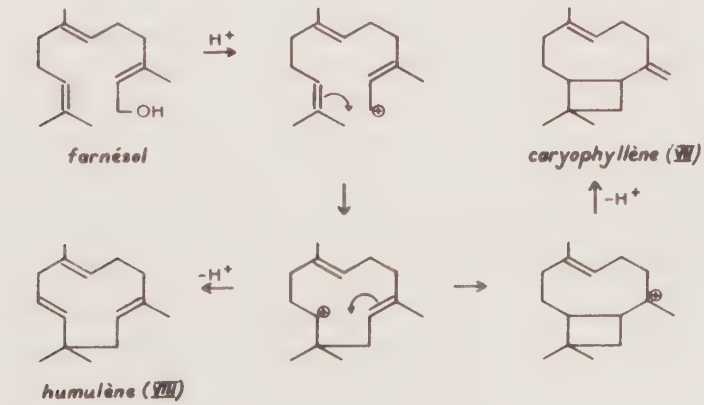
TABLEAU 5

Relations biogénétiques des composés terpéniques des essences d'*Hypericum*.

Monoterpènes :



Sesquiterpènes :



On l'isole dans le résidu de la distillation de l'essence d'*H. hirsutum* L. et on le caractérise de la même façon que le *n*-octanal.

Biogénèse des constituants des essences d'Hypericum.

L'étude chimique qui précède montre que les essences d'*Hypericum* renferment deux sortes de constituants :

1° Des aldéhydes et des carbures saturés, linéaires ou avec un groupement isopropyle terminal.

2° Des mono- et sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés.

En vue de l'étude taxonomique du genre *Hypericum* par les huiles essentielles, il est intéressant de voir si ces deux groupes de substances se différencient également par leur mode de formation dans la plante.

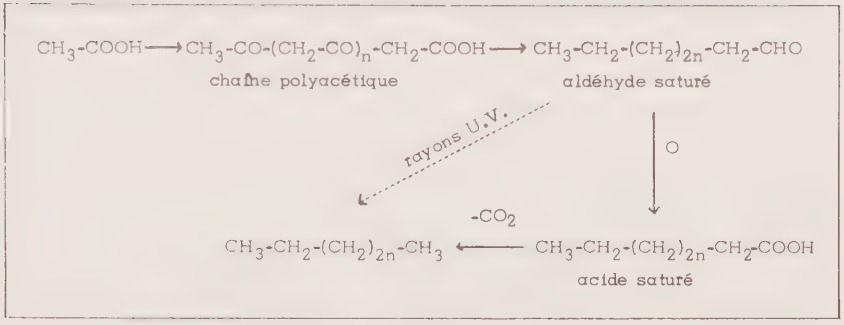
Les relations biogénétiques entre les terpènes sont actuellement bien connues grâce surtout aux travaux de RUZICKA **(120)**, auteur de la règle isoprénique ; tous les composés monoterpéniques dérivent d'un précurseur commun, le géraniol, alors que les composés sesquiterpéniques se rattachent tous au farnésol. Dans le tableau 5, nous montrons les relations biogénétiques entre les composés monoterpéniques des essences d'*Hypericum*, d'après une mise au point de CRABBE et OURISSON **(121)** (1957).

La biogénèse des carbures et des aldéhydes saturés linéaires, peu répandus dans le règne végétal, est encore moins bien établie. Mais il est frappant de constater que les aldéhydes des essences d'*Hypericum* ont un nombre pair d'atomes de carbone, alors que les carbures en renferment toujours un nombre impair. Or on sait qu'on peut passer des aldéhydes en C_n aux carbures en C_{n-1} par oxydation, puis décarboxylation (tableau 6). D'après SIGMUND **(122)**, ces transformations peuvent se faire en une étape sous l'action de la lumière U.V. Il semble donc probable que la plante utilise le même mécanisme et que les carbures proviennent de la dégradation des aldéhydes à un atome de carbone en plus.

D'ailleurs, quelques espèces de *Pinus* renferment également aldéhydes et carbures saturés, alors que la plupart des espèces de pins sont riches en monoterpènes. On pouvait donc penser que les carbures constituaient des produits de dégradation des monoterpènes. Mais dans le cas des *Pinus*, SANDERMANN et SCHWEERS **(123)** ont montré, à l'aide d'acide mévalonique marqué, que le *n*-heptane provenait directement de la condensation linéaire de plusieurs molécules d'acide acétique (tableau 6).

TABLEAU 6

Biogénèse des carbures et aldéhydes saturés linéaires.



Dans les essences d'*Hypericum*, on a trouvé jusqu'à présent les aldéhydes en C_{12}, C_{10} et C_8 et les carbures en C_{11} et C_9. Mais il est possible que certaines essences d'*Hypericum*, recueillies sans solvant, montreront la présence de petites quantités de *n*-heptane que nous n'avons pu mettre en évidence jusqu'ici.

D'autre part, nous avons isolé, dans l'essence d'*H.perforatum* L., le méthyl-2-octane qui, a priori, peut provenir soit d'un monoterpène par réduction et perte d'un groupement méthyle, soit directement de l'acide acétique comme son isomère, le *n*-nonane. L'origine monoterpénique paraît cependant exclue pour deux raisons : nous n'avons pu retrouver, dans aucune essence d'*Hypericum*, le diméthyl-2,6-octane qui pourrait être un composant intermédiaire entre les monoterpènes et les carbures saturés (à condition qu'il y ait réduction avant la perte du groupement méthyle); d'autre part, pour le méthyldécane que nous avons également caractérisé, l'origine monoterpénique n'entre plus en ligne de compte.

En conclusion, il nous semble donc que l'origine biogénétique des aldéhydes et carbures saturés à partir d'une chaîne polyacétique est très probable, ce qui prouverait l'unicité de ce groupe de substances. En essayant d'appliquer la composition chimique des essences à l'étude taxonomique du genre *Hypericum*, il faudra tenir compte avant tout de l'existence de deux groupes de substances du point de vue biogénétique.

Conclusions

L'étude de diverses essences d'*Hypericum* nous a permis d'identifier 14 constituants dont la plupart sont des composants

majeurs. Il reste à identifier un certain nombre de composants mineurs, au moins aussi nombreux, dont les plus intéressants du point de vue biogénétique et chimio-taxonomique sont certainement les sesquiterpènes. En dehors du caryophyllène et de l'humulène, les sesquiterpènes des essences d'*Hypericum* n'ont pu être identifiés avec des produits connus ; en particulier, nous n'avons pu retrouver les sesquiterpènes présumés par ZELLNER et PORODKO **(107)** par des réactions colorées. Il a été possible cependant de montrer que l'un des sesquiterpènes d'*H.perforatum* L. est azulénogène (coloration bleue avec le brome) et présente des groupements isopropylique et exo-méthylénique d'après les spectres I.R. et R.M.N.. D'après la chromatographie gazeuse, la présence d'une petite quantité de *n*-dodécanal (signalé par SALGUES(**60**)) dans certaines essences d'*Hypericum* paraît également probable, mais nous n'avons pu le confirmer avec certitude.

Il reste donc à résoudre quelques problèmes intéressants, mais très complexes, pour compléter nos connaissances sur la composition chimique des essences d'*Hypericum*.

CHAPITRE V

ETUDE CHIMIO-TAXONOMIQUE DU GENRE HYPERICUM AU MOYEN DES HUILES ESSENTIELLES

Dans ce chapitre, nous étudions la répartition des constituants précédemment identifiés dans les essences d'environ 35 espèces d'*Hypericum*, puis nous comparons cette répartition avec la classification botanique du genre *Hypericum*.

Méthodes employées

Comme nous ne disposions que de très faibles quantités des huiles essentielles de la plupart des espèces (voir tableau 13), il ne pouvait être question d'isoler les divers constituants. Nous les avons identifiés par comparaison avec les constituants précédemment caractérisés, à l'aide des microméthodes chromatographiques décrites dans le chapitre III :

- Chromatographie en phase gazeuse sur plusieurs phases stationnaires, soit avec un appareil à catharomètre à fil chauffant, soit le plus fréquemment avec un appareil à ionisation de flamme.
- Chromatographie sur couche mince, avec ou sans modification sélective de l'adsorbant par addition de nitrate d'argent **(95)**, et avec ou sans modification fonctionnelle de l'essence avant chromatographie (par bromation, époxydation, acétylation, saponification, déshydratation, etc.).
- Chromatographie gazeuse d'un constituant isolé par chromatographie sur couche mince préparative.

Pour quelques espèces dont les plants étaient insuffisants pour un entraînement à la vapeur d'eau, la chromatographie gazeuse directe sur la plante nous a fourni quelques indications sur la composition des essences (voir figure 8 p.ex.). Mais cette méthode nous a surtout permis de comparer la composition de l'essence provenant des diffé-

rents organes de la plante.

La composition quantitative de la fraction la plus volatile des essences (tableau 17) a été déterminée par la chromatographie gazeuse, comme nous l'indiquons au chapitre III.

Résultats et discussion

Le tableau 17 (partie expérimentale) groupe les résultats quantitatifs que nous avons obtenus sur la fraction « volatile » des huiles essentielles d'*Hypericum*. Cette fraction, constituée par des carbures saturés et les monoterpènes, est bien différenciée, en chromatographie gazeuse, par sa volatilité et sa faible polarité ; d'après l'étude de quelques essences, en chromatographie gazeuse avec programmation de température, elle constitue 60 à 80 % de l'essence (voir figure 6). Dans le tableau 17, les composants sont classés d'après leur point d'ébullition ; leur pourcentage est ramené à la fraction « volatile » de l'essence. Les espèces sont rangées d'après la classification ancienne de KELLER.

Le tableau 18 (partie expérimentale) donne la répartition, dans les huiles essentielles d'*Hypericum*, des autres composants identifiés (sesquiterpènes, alcools monoterpéniques, aldéhydes à chaîne linéaire) qui constituent une partie importante de la fraction « lourde ». La complexité de cette fraction (voir figure 6) est probablement due, en partie, à la présence de petites quantités de produits qui se sont formés au cours de l'isolement et de la conservation des essences ; c'est pourquoi, il est difficile d'interpréter avec certitude les pics mineurs en chromatographie gazeuse. Nous ne donnons donc qu'un schéma de la composition de la fraction lourde, suffisant pour tirer quelques conclusions taxonomiques.

Variations de la composition suivant les espèces.

Les tableaux 17 et 18 permettent de relever un certain nombre de relations intéressantes entre la classification botanique systématique et la composition des huiles essentielles du genre *Hypericum* :

1° La composition chimique qualitative des essences d'*Hypericum* (et peut-être de genres voisins avec l'exemple du *Vismia guineensis*) présente une assez grande homogénéité et différencie nettement les Hypéricacées de familles à essence assez voisines (Myrtacées, Rutacées, etc.). En dehors des oléo-résines des Conifères, la présence de carbures saturés liquides a été rarement décrite jusqu'ici dans les végétaux. A notre connaissance, c'est la première fois qu'on trouve dans le règne végétal des carbures

saturés liquides à chaîne ramifiée tels que le méthyl-2-octane (et probablement le méthyl-2-décane). EGLINGTON **(13)** signale des isoparaffines (groupement isopropyle terminal) parmi les carbures solides à longue chaîne de la cuticule des Cactacées.

2° Par contre, la composition chimique quantitative des essences varie très sensiblement d'une espèce à l'autre ; elle permet de répartir les espèces d'*Hypericum* en deux groupes nettement distincts :

a) Les espèces des sections *Eremanthe, Norysca, Androsaemum, Webbia* et *Myriandra* se caractérisent par une teneur élevée en limonène (plus de 10 % de la fraction volatile) et souvent par une proportion importante de myrcène et d'alcools monoterpéniques (α -terpinéol, géraniol) ; mais leur teneur en sesquiterpènes est faible en général.

b) Les espèces des sections *Roscyna, Euhypericum* et *Campylopus* sont pauvres en limonène (moins de 5 % de la fraction volatile), en myrcène et en alcools monoterpéniques ; mais elles contiennent généralement une proportion notable de sesquiterpènes.

Il est intéressant de noter que toutes les espèces du premier groupe ne renferment pas d'hypéricine, alors que le deuxième groupe présente des ponctuations d'hypéricine sauf dans la section *Roscyna.*

3° Dans la section *Euhypericum,* la composition des essences permet, à notre avis, de distinguer 4 groupes (voir tableau 7) :

a) Groupe à méthyl-2-octane (et probablement méthyl-2-décane) prédominant dans la fraction volatile, à sesquiterpènes prédominants dans la fraction lourde.

b) Groupe à carbures et aldéhydes saturés linéaires prédominants, à méthyl-2-octane en petite quantité.

c) Groupe à pinènes prédominants
d) Groupe à composition mixte (carbures et pinènes)

} répartition très variable des aldéhydes saturés et des sesquiterpènes ; absence de méthyl-2-octane.

Dans le groupe (a), le rapprochement d'*H.perforatum* L. et d'*H.olympicum* L., espèces morphologiquement très différentes, ne présente aucun intérêt taxonomique. Par contre, la composition de l'essence confirme la place particulière attribuée à *H. perforatum* L. par KELLER parmi les espèces des régions tempérées.

L'intérêt du groupe (b) est de réunir 4 espèces de la section *Perforata* Stef. * : *H. quadrangulum* L., *H. tetrapterum* Fries, *H. undulatum* Schousb. et *H. elegans* Steph. ; la présence d'un peu de méthyl-2-octane rapproche ces espèces d'*H. perforatum* L. de la même section et confirme ainsi les résultats obtenus par la répartition de l'hypéricine. *H. quadrangulum* L. (= *H. maculatum* Crantz = *H. dubium* Leers) se distingue nettement d'*H. tetrapterum* Fries par sa teneur plus élevée en pinènes et en sesquiterpènes.

Le groupe (c) à pinènes prédominants rapproche 3 espèces de nos régions, morphologiquement assez différentes : *H. montanum* L., *H. pulchrum* L., *H. humifusum* L. Ces espèces croissent dans des endroits relativement secs, ce qui les oppose aux espèces du groupe (b) de nos régions que l'on retrouve dans les endroits humides : *H. quadrangulum* L., *H. tetrapterum* Fries, *H. hirsutum* L..

Le groupe (d) réunit toutes les autres espèces étudiées de la section *Euhypericum*. Il rapproche des espèces très voisines par leurs caractères botaniques : *H. barbatum* Jacq. et *H. rumelicum* Boiss. (section *Drosocarpium* Stef.); *H. atomarium* Boiss. et *H. degenii* Bornm. (section *Montana* Stef.). D'ailleurs, ces deux dernières espèces sont également très proches d'*H. montanum* L. de la même section, à teneur assez élevée en *n*-undécane.

4° Les espèces d'*Hypericum* riches en limonène que nous avons étudiées, ne contiennent pas de carbures saturés ramifiés (sauf *H. inodorum* Willd.). On peut les classer en 2 groupes suivant la prédominance de carbures saturés linéaires ou de pinènes (tableau 7). Ces deux groupes ne correspondent guère aux sections de la classification de KELLER; mais ces sections sont loin d'être définitives : ROBSON propose p.ex. le rattachement de la section *Eremanthe* à la section *Norysca*.

Variations suivant les organes de la plante.

L'examen du tableau 13 (partie expérimentale, chapitre IV) montre que la teneur en essence des feuilles est deux à dix fois moins élevée que celle des fleurs et des fruits. Alors que l'essence obtenue à partir des fleurs et des fruits est généralement fluide et très peu colorée, celle isolée à partir des feuilles est jaunâtre et beaucoup plus visqueuse; ceci s'explique par une teneur beaucoup plus élevée de l'essence de fruits en constituants volatils.

La comparaison de la composition chimique des essences de

* Pour les sections de STEFANOFF, voir tableau 9.

fruits et de feuilles ne montre que des différences qualitatives minimes et des variations quantitatives irrégulières.

Dans le cas d'*H. calycinum* L., la chromatographie gazeuse directe à l'aide du four à pyrolyse (figure 7, chapitre III) a permis une comparaison très poussée de l'huile essentielle des différents organes : limbe, pétiole de la feuille, tige, calice, corolle, étamines, styles, ovaire, fruit. Elle a montré que tous les organes renferment l'huile essentielle et que les pinènes, constituants majeurs de l'essence d'*H. calycinum* L., prédominent dans toutes les parties de plantes étudiées. Cette expérience est assez facile à réaliser sur *H. calycinum* L. pour plusieurs raisons : il s'agit d'une espèce riche en essence, renfermant des constituants nettement prédominants ; de plus, les pièces florales assez grandes se séparent facilement.

Pour les espèces d'*Hypericum* pauvres en huile essentielle, la chromatographie gazeuse directe met souvent en évidence des variations importantes de la composition de l'essence sur divers échantillons d'un même organe (la feuille en particulier). Ces variations s'expliquent, à notre avis, par les différences de la composition de l'essence d'une feuille à l'autre, différences qui n'apparaissent pas sur l'essence «moyenne» obtenue par entraînement à la vapeur d'eau. En effet, les variations sont nettement plus faibles pour les espèces à petites feuilles dont on peut introduire une tige feuillée entière dans la cupule du four. En augmentant la capacité de la cupule du four, il doit être possible d'obtenir des chromatogrammes donnant la composition moyenne de l'essence quelle que soit la teneur de l'organe en huile essentielle.

Variations saisonnières.

Sauf chez *H. calycinum* L. dont le fruit est particulièrement riche en essence, la teneur en huile essentielle est maximum au moment de la floraison, comme l'a déjà signalé ROTH **(85)** .

La composition chimique qualitative de la fraction volatile, étudiée sur un certain nombre d'espèces (tableau 17), s'est avérée assez constante en cours d'année. Mais il semble que la proportion des carbures, maximum au moment de la floraison, diminue progressivement au profit des monoterpènes.

Variations avec l'âge de la plante.

La teneur en essence des plants de première année est voisine de celle des tiges feuillées avant floraison les années suivantes. La fraction volatile est plus abondante dans les jeunes plants, mais sa composition est sensiblement la même en général.

TABLEAU 7

Classification des espèces d'Hypericum étudiées

Fraction volatile riche en limonène et souvent en myrcène ; parfois prédominance d'alcools monoterpéniques dans la fraction lourde	Pas d'autre constituant prédominant
	Pinènes prédominants .....
	Carbures saturés linéaires prédominants .....
	Composition mixte : environ 10 % de limonène .....
Fraction volatile pauvre en limonène et en myrcène ; fraction lourde à prédominance de sesquiterpènes et parfois d'aldéhydes saturés linéaires	*n*-nonane fortement prédominant (environ 80 %) .....
	méthyl-2-octane prédominant (au moins 30 % de la fraction volatile) .....
	carbures et aldéhydes saturés linéaires prédominants ; un peu de méthyl-2-octane .....
	pinènes prédominants ; pas de méthyl-2-octane .....
	composition mixte ; pas de méthyl-2-octane .....

d'après la composition de l'essence.

H. canariense L.	sect. *Webbia*
H. androsaemum L.	sect. *Androsaemum*
H. elatum Ait.	sect. *Androsaemum*
H. chinense L.	sect. *Norysca*
H. calycinum L.	sect. *Eremanthe*
H. hircinum L.	sect. *Androsaemum*
H. inodorum Willd.	sect. *Androsaemum*
H. patulum Thunb.	sect. *Norysca*
H. hookerianum Wight	sect. *Norysca*
H. prolificum L.	sect. *Myriandra*
H. kalmianum L.	sect. *Myriandra*
H. ascyron L.	sect. *Roscyna*
H. gebleri Ledeb.	sect. *Roscyna*
H. perforatum L.	sect. *Euhypericum*
H. olympicum L.	sect. *Euhypericum*
H. polyphyllum Boiss.	sect. *Euhypericum*
H. tetrapterum Fries	sect. *Euhypericum*
H. undulatum Schousb.	sect. *Euhypericum*
H. quadrangulum L.	sect. *Euhypericum*
H. hirsutum L.	sect. *Euhypericum*
H. elegans Steph.	sect. *Euhypericum*
H. coris L.	sect. *Euhypericum*
H. montanum L.	sect. *Euhypericum*
H. pulchrum L.	sect. *Euhypericum*
H. humifusum L.	sect. *Euhypericum*
H. orientale L.	sect. *Euhypericum*
H. tomentosum L.	sect. *Euhypericum*
H. atomarium Boiss.	sect. *Euhypericum*
H. degenii Bornm.	sect. *Euhypericum*
H. barbatum Jacq.	sect. *Euhypericum*
H. rumelicum Boiss.	sect. *Euhypericum*
H. rhodopeum Friv.	sect. *Campylopus*

Variations avec l'origine géographique.

Pour quelques espèces d'*Hypericum*, récoltées dans divers endroits, l'origine géographique n'a montré qu'une influence réduite sur la composition de l'essence, du moins sur les composants les plus abondants (voir tableaux 13 et 17). Un cas particulièrement probant nous semble cette essence d'*H. perforatum* L., obtenue à partir des fruits cueillis en Italie au mois de septembre (sur des pieds brûlés par le soleil et sans feuilles) qui renfermait encore 35 % de méthyl-2-octane. En culture, des pieds d'*H. olympicum* L., obtenus à partir des graines de cinq origines différentes, ont fourni des essences dont les proportions des principaux constituants variaient dans des limites étroites.

Quelques essences d'*Hypericum (H. quadrangulum* L. en particulier) manifestent une certaine instabilité de leur composition chimique, qui paraît liée aux facteurs extérieurs. Cette instabilité s'explique peut-être, en partie du moins, par l'existence, dans la nature, de nombreux hybrides interspécifiques que la morphologie ne permet pas toujours de reconnaître.

Conclusions

L'étude de la répartition de l'hypéricine avait permis de vérifier les grandes lignes de la classification botanique du genre *Hypericum;* mais les résultats très stricts et peu variés empêchaient toute distinction d'espèces voisines. Grâce à l'étude des essences, nous avons pu multiplier les relations entre la composition chimique et la classification du genre *Hypericum.* Du fait de la complexité de la composition des essences, nous avons différencié un grand nombre d'espèces entre elles par leur « image chromatographique », obtenue en chromatographie gazeuse ou sur couche mince. Cette image chromatographique a d'autant plus de valeur chimio-taxonomique qu'elle dépend probablement peu des facteurs extérieurs, du moins en ce qui concerne les constituants prépondérants. Le tableau 7 donne la classification des espèces d'*Hypericum* étudiées, d'après la composition de leurs essences.

CHAPITRE VI

HYBRIDATION ET COMPOSITION DES ESSENCES D'HYPERICUM.

Races morphologiques et races chimiques

Certaines espèces présentent, dans la nature, des variations morphologiques importantes : tantôt ce polymorphisme est inconstant et s'explique par l'influence des facteurs extérieurs, tantôt il est lié à la structure des gènes et se transmet à la descendance. Dans ce dernier cas, il existe, à l'intérieur de l'espèce, plusieurs *races morphologiques* qui se différencient par un ou plusieurs caractères morphologiques bien définis.

L'*autofécondation* met en évidence les races morphologiques susceptibles d'exister à l'intérieur d'une espèce. Si l'espèce est constituée par une race unique, il apparaît par autofécondation à la première génération des plants possédant tous la même morphologie. Au contraire, dans le cas où l'espèce englobe plusieurs races morphologiques, l'autofécondation produira une *disjonction*, c'est-à-dire qu'elle fera apparaître à la première génération des plants appartenant à des types morphologiques différents. En désignant par A, B, C, etc., les caractères morphologiques dominants de l'espèce et par *a*, *b*, *c*, etc., les caractères morphologiques récessifs, on peut prévoir l'apparition par autofécondation, de plants à caractères morphologiques nouveaux, liés aux facteurs *aa*, *bb*, *cc*, etc..

En étudiant la composition chimique d'une espèce, on fait parfois les mêmes constatations : une espèce morphologiquement bien définie peut présenter des divergences très nettes dans la composition chimique, le plus souvent quantitatives, mais reproductibles dans la descendance. On donne le nom de *races chimiques* aux différents groupes de plantes d'une espèce qui sont morphologiquement identiques, mais qui diffèrent par leur composition chimique. On connaît quelques cas exceptionnels de races chimiques existant à l'état naturel pour des espèces autofécondables et dont

l'isolement géographique favorise l'autofécondation. Pour mettre en évidence les races chimiques, on est obligé le plus souvent de recourir à l'autofécondation artificielle qui produit la disjonction et l'apparition de lignées pures.

L'existence des races chimiques est connue de longue date : l'exemple le plus classique est celui des variétés douce et amère de l'amandier qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'hétéroside cyanogénétique dans l'amande. La plupart des exemples sont fournis par les plantes médicinales pour lesquelles la teneur en principes actifs est primordiale. Aussi est-ce lors d'un Colloque international sur les plantes médicinales (Wageningen,1957) **(124)** qu'ont été discutés la signification des races chimiques et les résultats obtenus pour les différents groupes de principes actifs. DILLEMANN, dans une série de mémoires (1959-61) **(125)**, fait une mise au point des problèmes posés par les races chimiques dans les plantes médicinales.

Hybridation et autofécondation dans le genre Hypericum.

Des exemples d'hybrides naturels et artificiels sont bien connus dans le genre *Hypericum* : *H. moserianum* André est un hybride horticole qui figure déjà dans le premier supplément de l'*Index kewensis* (1900). Pour les espèces d'*Hypericum* des régions tempérées, divers auteurs (HERBST **(126)**, NOACK **(127)**) décrivent des hybrides entre espèces voisines, en particulier pour *H. perforatum* L., *H. quadrangulum* L., *H. tetrapterum* Fries.

Cas de l'hybride horticole H. moserianum André.

Il s'agit d'un hybride entre *H. calycinum* L. (section *Eremanthe)* et *H. patulum* Thunb. (section *Norysca).* L'échantillon que nous avons utilisé est conforme à la description de HEGI **(29)** et ROBSON **(25)** a confirmé son identité botanique. Morphologiquement, cet hybride ressemble à *H. patulum* Thunb. dont il se distingue assez difficilement. Par la composition de son essence, riche en pinènes (tableaux 13, 17 et 18, références n° 17 et 18), il se rapproche, par contre, d'*H. calycinum* L.. Dans ce cas, la chimie peut donc contribuer à l'identification d'un hybride.

Hybrides naturels entre H. perforatum L. et H. quadrangulum L.

On trouve, dans la nature, de nombreux types morphologiques intermédiaires entre les deux espèces, souvent dus à des hybrides. Nous avons étudié un type (tableaux 13, 17 et 18, référence n° 33),

récolté en quantité importante dans la nature, présentant les caractères suivants : sépales obtus, feuilles ovales, elliptiques, à nervures saillantes et à hypéricine régulière sur les bords comme *H. quadrangulum* L. ; tige à 2 angles, perforations des feuilles et croissance dans un lieu sec comme *H. perforatum* L.. Du point de vue chimique, cette forme morphologique présente également une essence de composition intermédiaire ; ceci est particulièrement net pour le méthyl-2-octane et l' α -pinène (voir tableau 17).

Essai d'autofécondation artificielle.

Pour les espèces d'*Hypericum* des régions tempérées, l'autofécondation dans la nature est fréquente et son mécanisme est bien connu : en fin de floraison, les fleurs non fécondées par les insectes sont autofécondées par rabattement des étamines sur le pistil.

En vue de réaliser l'autofécondation artificielle d'*H. perforatum* L., nous avons donc simplement protégé les inflorescences durant la floraison par des sacs en tissu. Les lots de graines, recueillies sur chaque pied, ont été semés en pots à l'automne. L'année suivante, nous avons étudié les plants de première génération (sans fleurs, ni fruits), à la fois du point de vue morphologique et chimique. Dans les différents lots, on retrouve des plants de deux types morphologiques : le type I présente tous les caractères d'*H. perforatum* L., le type II est très proche d'*H. quadrangulum* L. ; la proportion du type II varie de 0 à 50 % suivant les lots.

L'étude de la composition chimique de l'essence, avec ou sans four à pyrolyse en chromatographie gazeuse, confirme la distinction des deux types, du moins en examinant le rapport MO/N (méthyl-2-octane/*n*-nonane) : les plants du type I présentent toujours un rapport MO/N supérieur à 2, comme *H. perforatum* L. ; pour les plants du type II, le rapport MO/N est inférieur à 1/5, comme pour *H. quadrangulum* L. (voir tableau 17).

Du fait que les conditions de la culture ne nous permettent pas d'exclure une contamination extérieure, il nous semble hasardeux de formuler une hypothèse sur les résultats de l'autofécondation d'*H. perforatum* L.. On peut simplement noter que, parmi les plants de même morphologie, nous n'avons pu mettre en évidence des variations importantes dans la composition de l'essence. De nouvelles expériences seront nécessaires pour tirer une conclusion certaine.

CHAPITRE VII

ETUDE DE L'EXTRAIT BENZENIQUE D'H. PERFORATUM L.

Partie bibliographique

Parmi les constituants non volatils d'*Hypericum perforatum* L., les pigments ont été le mieux étudiés ; nous avons vu plus haut (chapitre II) les travaux concernant l'hypéricine. Parallèlement des recherches ont été effectuées en vue de l'identification des matières colorantes flavoniques jaunes. DIETERICH **(63)** (1891) et CZERNY **(62)** (1911) ont mis en évidence l'existence d'un pigment jaune à côté de l'hypéricine. O'NEILL et PERKIN **(128)** (1918) ont montré la présence de quercétine (3, 3', 4', 5, 7 - pentahydroxyflavone). C'est à JERZMANOWSKA **(129)** (1937) qu'on doit l'isolement d'un flavonoside nouveau, appelé *hypérine* ou mieux *hypéroside* quercétine-3-galactoside), qu'on a retrouvé par la suite dans des végétaux très divers. Récemment, MICHALUK et BRUNARSKA **(130)** (1957), puis GRIMS **(131)** (1959) ont étudié la répartition des composés flavoniques (hypéroside, rutoside, quercétine, etc.) dans différentes espèces d'*Hypericum*. SALGUES **(60)** (1961) appelle hypérine un hétéroside jaune, isolé d'*H. perforatum* L., dont le sucre serait le rhamnose.

En dehors des pigments, un travail d'ensemble sur les constituants non volatils des parties aériennes d'*H. perforatum* L. est dû à ZELLNER et PORODKO **(107)** (1925) ; ces auteurs ont mis en évidence les carbures saturés linéaires en C_{33} et C_{36}, l'alcool cérylique, les acides myristique, palmitique et stéarique, la choline, des tanins catéchiques, etc.. CHAPLINSKAYA **(132)** (1957) signale la présence d'une petite quantité de vitamine C, de carotène et de saponines dans *H. perforatum* L.. SALGUES **(60)** (1961) isole les carbures saturés linéaires en C_{28} et C_{38} à partir des racines de deux espèces d'*Hypericum* sud-américaines et le mannitol à partir des souches et tiges d'*H. perforatum* L..

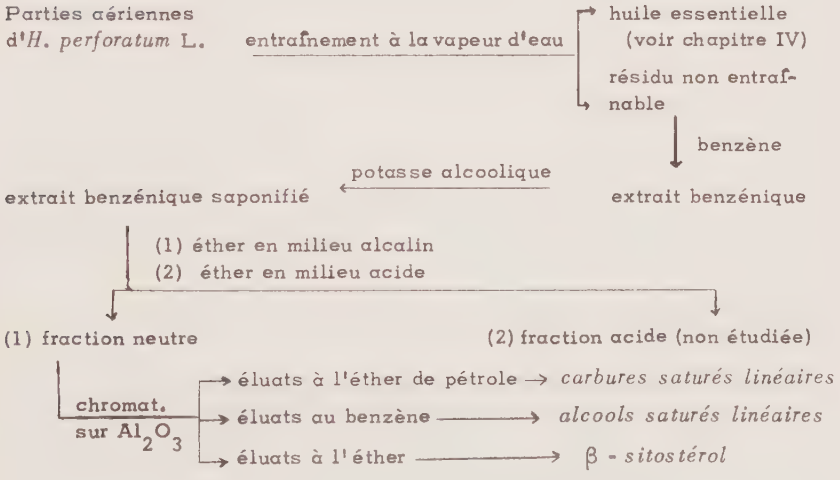
Afin de donner une idée des proportions des constituants de la plante, nous jugeons utile de rappeler quelques valeurs signalées par ZELLNER et PORODKO (**107**) concernant les feuilles et tiges d'*H. perforatum* L. (pourcentages ramenés à la plante sèche) :

extrait à l'éther de pétrole	1,59 %	tanins	10,85 %
» éthéré	3,30 %	azote total	2,44 %
» alcoolique	16,75 %	cendres	11,97 %
» aqueux	33,45 %	acidité libre (exprimée en KOH)	3,57 %

Travaux personnels

En traitant les parties aériennes d'*H. perforatum* L. par le benzène, on laisse insolubles les sels minéraux, les glucides, les protéines, une grande partie des pigments (flavones, hypéricine) pour ne dissoudre que les constituants organiques, faiblement ou non oxygénés ; nous avons préparé l'extrait benzénique sur le résidu de l'entraînement à la vapeur d'eau (voir tableau 8).

TABLEAU 8



Nous n'avons pas étudié la fraction acide, relativement peu abondante et de composition fort complexe d'après les chromatoplaques ; cette fraction semble d'ailleurs constituée en grande partie par les acides gras signalés par ZELLNER et PORODKO(**107**) .

Carbures saturés à longue chaîne : CH_3-$(CH_2)_n$-CH_3 (n = 26 et 28).

Le résidu d'évaporation des éluats à l'éther de pétrole (tableau 8), recristallisé dans le méthanol, fournit des paillettes blanches que nous avons identifiées comme un mélange d'octacosane C_{28} H_{58} et de triacontane C_{30} H_{62} pour les raisons suivantes :

- L'analyse élémentaire, la réaction négative au tétranitrométhane, le spectre infra-rouge et le comportement sur chromatoplaque montrent qu'il s'agit d'un ou plusieurs carbures saturés ; la bande (CH_3) faible à 1370 cm^{-1} permet de penser que ce carbure est à chaîne linéaire.

- Le point de fusion (63°-64°) correspond à celui du nonacosane C_{29} H_{60} (64°) **(133)**, mais le spectre de masse démontre qu'on a à faire à un mélange des carbures en C_{28} (F = 62°) et en C_{30} (F = 66°).

PIPER et CHIBNALL **(134)** avaient déjà signalé qu'un mélange de carbures solides présente toujours un point de fusion intermédiaire entre les points de fusion des constituants du mélange. ZELLNER et PORODKO **(107)** avaient probablement isolé les mêmes carbures (F : 63° et 68°), mais les mesures cryoscopiques étaient entachées d'erreurs par excès. D'après nos résultats (carbures en C_{28} et en C_{30}) et ceux de SALGUES (carbures en C_{28} et en C_{38}), il semble que les carbures à longue chaîne présentent un nombre pair d'atomes de carbone dans le genre *Hypericum*.

Alcools saturés à longue chaîne : CH_3-$(CH_2)_n$-CH_2OH (n = 22, 24, 26)

Le résidu d'évaporation des éluats avec le mélange benzène-éther, recristallisé à plusieurs reprises dans le benzène, donne un produit blanc, non dédoublable sur chromatoplaque, qui a été identifié de la façon suivante :

- Le spectre infra-rouge est celui d'un alcool saturé linéaire.

- D'après l'analyse élémentaire et le point de fusion (79°), il pourrait s'agir de l'alcool cérylique en C_{26} (littérature **(135)** : F = 80°) ; cette présomption est renforcée par l'analyse élémentaire et le point de fusion (63°) du dérivé acétylé (littérature **(135)** : F = 60°), obtenu par acétylation pyridinée.

- La chromatographie gazeuse montre qu'il s'agit, en réalité, d'un mélange d'alcools saturés linéaires en C_{24}, C_{26} et C_{28} en quantités sensiblement égales, difficiles à séparer sur chromatoplaques et dont le point de fusion en mélange est également intermédiaire.

Les alcools saturés linéaires possèdent donc, comme les carbures, un nombre pair d'atomes de carbone dans le genre *Hypericum.*

β - *sitostérol :* $C_{29}H_{50}O$ (= 3 β -hydroxy-24-éthyl-cholesta-5-ène).

Parmi les nombreux constituants des éluats éthérés, nous avons pu identifier le β -sitostérol, par comparaison avec le produit pur, de la façon suivante :

- Concordance des analyses élémentaires et des points de fusion **(136)** .
- Concordance des spectres infra-rouges du β -sitostérol et de son dérivé acétylé.
- Mêmes comportements du β -sitostérol et de son dérivé acétylé sur chromatoplaques.

N.B. Des chromatoplaques, effectuées sur l'extrait benzénique non saponifié, montrent que les alcools saturés et le β -sitostérol sont libres, au moins en partie, déjà avant la saponification.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail avait pour but principal d'étudier la taxonomie du genre *Hypericum* par la composition chimique : l'hypéricine, matière colorante rouge, et l'huile essentielle. Nous résumons à la fin des chapitres II et V les conclusions auxquelles nous sommes parvenu. Nos résultats contribueront, nous l'espérons, à élucider la classification systématique de la vaste section *Euhypericum;* ils apportent souvent une confirmation de celle des autres sections.

En vue de la localisation directe de l'hypéricine sur un échantillon de plante, nous avons mis au point une méthode d'empreinte sur papier chromatographique qui présente plusieurs avantages : elle permet simultanément l'identification de l'hypéricine par ses propriétés analytiques et elle est applicable à des échantillons d'herbier très anciens (plus de 100 ans d'âge). A l'aide de cette méthode et des procédés de localisation classiques, moins spécifiques, nous avons recherché l'hypéricine dans 220 espèces d'*Hypericum* soit sur la plante fraîche soit sur des échantillons d'herbier.

Les huiles essentielles d'*Hypericum* ont été isolées par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes fraîches, récoltées dans la nature ou obtenues par culture à partir des graines. Sur quelques essences, disponibles en quantité notable, nous avons identifié les composants suivants :

méthyl-2-octane
méthyl-2-décane ?
n-nonane
n-undécane
α -pinène
β -pinène
limonène
myrcène
α -terpinéol
géraniol
n-octanal
n-décanal
caryophyllène
humulène

A notre connaissance, c'est la première fois qu'on isole un carbure saturé liquide à chaîne ramifiée d'une huile essentielle. Il est également intéressant de noter la présence simultanée d'aldéhydes et de carbures saturés linéaires ; nous pensons que les carbures en C_n dérivent des aldéhydes en C_{n+1} par oxydation, puis décarboxylation.

Pour l'étude des autres huiles essentielles d'*Hypericum* dont nous n'avions qu'une faible quantité (moins de 1 g et souvent moins de 100 mg), nous avons été amené à mettre au point des microméthodes chromatographiques, applicables sur quelques mg de substance (voir chapitre III). La chromatographie fonctionnelle sur couche mince que nous avons adaptée même aux réactions lentes (estérification p.ex.), consiste à modifier les fonctions des corps à caractériser par des réactifs appropriés et à suivre les transformations sur chromatoplaques. L'analyse en chromatographie gazeuse de substances isolées par chromatographie préparative sur couche mince permet d'attribuer à un pic inconnu les fonctions mises en évidence par la seconde méthode. La chromatographie gazeuse «directe» permet d'obtenir directement sur un échantillon de plante un chromatogramme avec les pics des constituants ; elle s'est avérée particulièrement intéressante dans les cas où l'isolement de l'huile essentielle n'était pas possible : comparaison de l'essence des différents organes de la plante (chapitre V) et expériences d'autofécondation artificielle (chapitre VI). Grâce à ces méthodes appliquées sur environ 35 espèces d'*Hypericum*, nous avons constaté une certaine homogénéité de la composition qualitative des essences et l'intérêt taxonomique de la composition quantitative.

En outre, nous avons montré l'utilité de la connaissance de la composition de l'essence pour faciliter l'identification des hybrides (chapitre VI) et nous avons signalé quelques composants caractérisés dans *H. perforatum* L. : carbures et alcools à longue chaîne, β -sistostérol (chapitre VII).

Cependant nous pensons que les applications d'une telle étude ne devraient pas se limiter à la famille des Hypéricacées. Les microméthodes que nous avons mises au point sont applicables à toutes les familles à essence dont elles devraient hâter une étude plus systématique. Nous voudrions également indiquer la façon dont on peut concevoir dorénavant une étude chimio-taxonomique : dans un premier temps, on peut procéder à l'identification des constituants sur les espèces disponibles en quantité importante par les méthodes classiques, puis on examine les autres espèces à l'aide de microméthodes analytiques, par comparaison avec les précédentes. De cette façon seulement, on peut espérer obtenir pour une famille ou un genre des résultats étendus sur la composition chimique tout en identifiant les constituants avec le maximum de certitude possible.

Tableau 9. **Répartition de l'hypéricine dans le genre Hypericum (chapitre II)**

D'après l'*Index kewensis*, les noms d'espèces indiqués entre parenthèses seraient équivalents à ceux qui les précèdent ; mais vu certaines équivalences douteuses, nous donnons séparément les résultats obtenus.
Section de KELLER : en lettres majuscules ; sous-section de KELLER : en lettres minuscules.
Organes de la plante : f = feuille, p = pétale, s = sépale, t = tige.
Origine de l'échantillon : F = frais, HS = Herbier Strasbourg, HP = Herbier Paris.

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
TRIADENIA	*H. aegypticum* L. *H. baumii* Engl. et Gilg	*Triadenia*	Egypte Afr. trop.	-	H S	- +	73 60
ADENOTRIAS	*H. russeggeri* Fenzl	*Adenotrias*	Syrie	-	H S		
ELODES	*H. elodes* L.	*Elodes*	Eur. occid.	-	H S	-	71, 73
ELODEA	*H. breviflorum* Wall. *H. virginicum* L. *(H. tubulosum* Walt.)		Himalaya Amér. bor.	- - -	H P H S H S		
THASIUM	*H. thasium* Griseb.	*Thasium*	Balkans	f p s	H P		
EREMANTHE	*H. calycinum* L. *H. cernuum* Roxb. *(H. oblongifolium* Choisy) *H. aitchisonii* Drumm.	*Eremanthe*	Caucase Himalaya Asie centrale	- - - -	F H P H S H P	{ + { -	60 71, 73, 77, 79

CAMPYLOSPORUS	*H. lanceolatum* Lam. *(H. angustifolium* Lam.) *(H. leucoptychodes* Steud.) *H. schimperi* Hochst. *H. quartinianum* Rich. *(H. roeperianum* Schimp.)		Afr. trop. Ethiopie Ethiopie	f p s f p s f p s f p s f p s f p s	H S H P H S H S H S H P	+	60
NORYSCA	*H. gnidiaefolium* Rich. *H. chinense* L. *(H. monogynum* L.) *(H. salicifolium* Sieb. et Zucc.) *H. formosanum* Maxim. *H. mysorense* Wight *H. lysimachioides* Wall. *H. cordifolium* Choisy *H. reptans* Hook. et Thoms. *H. tenuicaule* Hook. et Thoms. *H. hookerianum* Wight et Arn. *(H. leschenaultii* Choisy) *H. patulum* Thunb. *H. patulum* Thunb. var. *henryi* Bean *H. moserianum* André (= *patulum* × *calycinum)*		Ethiopie Chine Formose Inde orient. Himalaya Himalaya Himalaya Himalaya Himalaya Himalaya Horticole Horticole	f p s - - - - - - - - - - - - - -	H S H S H S H P H P H S H P H P H P H P F H S F F F	- - - - -	73 73 73, 77 77 77
ROSCYNA	*H. ascyron* L. *H. pyramidatum* Ait. *H. przewalskii* Maxim. *H. gebleri* Ledeb.		Asie, Amér. bor. Amér. bor. Asie centr. Asie bor.	- - - -	F H S H P F	- - -	73 73, 77 73
PSOROPHYTUM	*H. balearicum* L.	*Psorophytum*	Baléares	-	H S	+ (pl. fraîche)	60

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
ANDROSAEMUM							
Euandrosaemum	*H. androsaemum* L.	*Androsaemum*	Asie Mineure	-	F	-	73, 77, 79
Pseudandrosaemum	*H. inodorum* Willd.	*Inodorum*	Asie Mineure	-	F	+ var. *glandulosum*?	77
	H. hircinum L.	*Pseudandrosaemum*	Méditerranée	-	F	-	71, 73
	H. grandifolium Choisy	»	Canaries	-	H S		
	H. foliosum Ait.	»	Açores	-	H S		
	H. elatum Ait.	»	Amér. bor.	-	F	-	73
	H. concinnum Benth.	»	Californie	f p s	H P		
WEBBIA	*H. cambessedesii* Coss.	*Pseudandrosaemum*	Baléares	-	H P		
	H. canariense L.	*Webbia*	Canaries	-	F		
	H. floribundum Ait.	»	Canaries	-	F		
HUMIFUSOIDEUM	*H. peplidifolium* Rich.		Ethiopie	f p s	H S		
EUHYPERICUM							
Coridium	*H. coris* L.	*Coridium*	Eur. orient.	s	F	s +	73 77
	H. empetrifolium Willd.	*Empetrifolia*	Asie Mineure	s	H S		
	H. ericoides L.	*Ericoides*	Espagne	s	H S		
	H. roberti Coss.	»	Algérie	p s	H P		
Olympia	*H. olympicum* L.	*Olympia*	Asie Mineure	f p s	F	f p s +	73 77
	H. polyphyllum Boiss. et Bal.	»	Asie Mineure	f p s	F	f p s -	60, 73 77
	H. apollinis Boiss. et Heldr.	*Drosocarpium (c)*	Grèce	f p s	H P		

Triadenioidea	*H. scopulorum* Balf.		Socotra	p s	H P		
	H. cuisini Barbey	*Montana (a)*	Eur. orient.	f p s	H P		
	H. modestum Boiss.	*Modesta*	Chypre	f p s	H P		
	H. cuneatum Poir.	*Cuneatum*	Asie Mineure	f p s	H S		
	H. fragile Heldr. et Sart.	*Fragilia*	Eur. orient.	f p s	F	+	71
	H. serpyllifolium Lam.	*Serpyllifolia*	Syrie	p s	H S		
	H. crenulatum Boiss.	*Nummularia*	Asie Mineure	p s	H S		
	H. nummularium L.	»	Pyrénées, Alpes	p s	F		
Arthrophyllum	*H. rupestre* Jaub. et Spach	*Arthrophyllum*	Asie Mineure	-	H S		
	H. cardiophyllum Boiss.	»	Syrie	-	H P		
	H. nanum Poir.	»	Syrie	-	H S		
Crossophyllum	*H. orientale* L.	*Crossophyllum*	Asie Mineure	-	F	-	73
	(*H. jauberti* Spach)	»		-	H P		
	H. adenotrichum Spach	»	Asie Mineure	f p s	H S		
	(*H. myriotrichum* Boiss.)	»		f p s	H S		
Oligostema	*H. humifusum* L.	*Oligostema*	Eurasie	f p s	F	f p s +	73 71, 77
Homotaenium	*H. bupleuroides* Griseb.	*Bupleuroides*	Asie Mineure	p s	H S		
	H. pulchrum L.	*Pulchra*	Europe	p s	F	p s +	73 71, 77
	H. venustum Fenzl	»	Asie Mineure	p s	H S		
	H. amanum Boiss.	»	Syrie	(f ?) p s	H P		
	H. scabrum L.	*Scabra*	Asie Mineure	p s	H S		
	H. olivieri Spach	*Hirtella (c)*	Mésopotamie	(f ?) p s	H P		
	H. leptocladum Boiss.	»	Mésopotamie	(f ?) p s	H P		
espèces velues	*H. assyriacum* Boiss.	*Hirtella (b)*	Mésopotamie	p s	H P	p s	73
	H. hirtellum Boiss.	»	Iran	p s	H P		

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
espèces velues	*H. hirsutum* L.	*Hyssopifolia (a)*	Eurasie	p s	F	p s	73
	H. kotschyanum Boiss.	*Hyssopifolia (b)*	Asie Mineure	p s	H P	+	71, 77, 79
	(*H. velutinum* Boiss.)	»		p s	H S	-	73
	H. confertum Choisy	*Hyssopifolia (c)*	Asie Mineure	p s	F		
	H. neurocalycinum Boiss.	*Hyssopifolia (d)*	Asie Mineure	p s	H S		
	H. pruinatum Boiss. et Bal.	*Hyssopifolia (e)*	Asie Mineure	p s	H S		
	H. tomentellum Freyn	»	Asie Mineure	p s	H P		
Homotaenium (suite)	*H. armenum* Jaub. et Spach	*Hyssopifolia (f)*	Arménie	p s	H S		
	H. laeve Boiss. et Hausskn.	*Hyssopifolia (b)*	Asie Mineure	p s	H P		
	H. thymopsis Boiss.	»	Mésopotamie	p s	H P		
	H. tauricum Keller	»	Crimée	p s	H P		
	H. hyssopifolium Vill.	*Hyssopifolia (b)*	Eurasie	f p s	F		
	(*H. lydium* Boiss.)	»		f p s	H P		
	H. helianthemoides Boiss.	»	Asie Mineure	f p s	H S		
	H. asperulum Jaub. et Spach	»	Iran	f p s	H P		
	H. sintenisii Freyn	*Spectabiles*	Arménie	p s	H P		
	H. leichtlini Stapf	»	Iran	p s	H P		
	H. callianthum Boiss.	»	Iran	f p s	H P		
	H. spectabile Jaub. et Spach	»	Syrie	f p s	H P		
	H. retusum Auch.	»	Syrie	f p s t	H P		
	H. reflexum L.	*Reflexa*	Canaries	f p s	H S		
	H. glandulosum Ait.	»	Canaries	f p s	H S		
	H. apricum Kar. et Kir.		Turkestan	f p s	H P		
	H. repens L.		Eur. orient.	f p s	F	f p s	73
	H. australe Tenore	*Montana (d)*	Méditerranée	f p s	H S		
	H. linarifolium Vahl	»	Eur. occid.	f p s	F		
	H. aucheri Jaub. et Spach	»	Asie Mineure	f p s	H P		
	H. tenellum Janka	»	Eur. orient.	f p s	H P		

	H. montanum L.	*Montana (c)*	Europe	f p s	F	f p s +	73 71, 77, 79
(	*H. delphicum* Boiss. et Heldr.	*Montana (c)*	Grèce	f p s	H S		
(	*H. degenii* Bornm.	»	Balkans	f p s	F	f p s t	73
(	*H. lanuginosum* Lam.	»	Asie Mineure	f p s	F		
(	*H. atomarium* Boiss.	»	Asie Mineure	f p s	F	f p s	73
(	*H. scabrellum* Boiss.	»	Asie Mineure	f p s	H P		
(	*H. coadnatum* Smith	*Montana (b)*	Canaries	f p s	H P		
(	*H. naudinianum* Coss.	»	Afr. sept.	f p s	H S		
espèces (	*H. caprifolium* Boiss.	»	Espagne	f p s	H S		
velues (	*H. sinaicum* Hochst.	»	Arabie	f p s	H P		
(	*H. arabicum* Steud.		Arabie	f p s	H S		
(	*H. intermedium* Steud.		Ethiopie	f p s	H S		
(							
(	*H. tomentosum* L.	*Perforata (a)*	Méditerranée	f p s	F	f p s	73
(	(*H. suberosum* Salzm.)			f p s	H S		
(	(*H. pubescens* Boiss.)			f p s	H S		
(	*H. lusitanicum* Poir.	»	Portugal	f p s	H P		
	H. scouleri Hook.		Amér. bor.	f p s	H P		
	H. graveolens Buckleyi		Amér. bor.	f p s	H P		
	H. simulans Rose		Mexique	f p s	H P		
	H. formosum Kunth		Mexique	f p s	H P		
	H. morarense Keller		Japon	f p s	H P		
	H. hakonense Franch. et Sav.		Japon	f p s	H P	+	78
	H. oliganthum Franch. et Sav.		Japon	f p s	H P	+	78
	H. yezoense Maxim.		Japon			+	78
	H. erectum Thunb.		Japon	f p s	H S	+	78
	H. kamtschaticum Ledeb.		Kamtschatka	f p s	H P	+	78
	H. seniawini Maxim.		Chine	f p s	H P		
	H. monanthemum Hook.		Himalaya	f p s	H P		
	H. elodeoides Choisy		Himalaya	f p s	H P		
	H. napaulense Choisy		Himalaya	f p s	H P		
	H. afrum Lam.	*Perforata (c)*	Afr. sept.	f p s	H S		
	H. aethiopicum Thunb.		Afr. orient.	f p s t	H S		
	H. attenuatum Choisy		Mongolie	f p s t	H P	+	78

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
	H. corymbosum Mühl		Amér. bor.	f p s t	H P		
	(H. punctatum Lam.)			f p s t	H S		
	(H. maculatum Walt.)			f p s t	H S		
	H. elegans Steph.	*Perforata (b)*	Eurasie	f p s t	F	f p s t +	73 77
	(H. kohlianum Spreng)			f p s t	H S		
	H. crispum L.	*Perforata (d)*	Méditerranée	f p s t	H S	+	64
	H. undulatum Schousb.	*Perforata (c)*	Espagne	f p s t	F		
Homotaenium (suite)	*(H. baeticum* Boiss.)	*Perforata (c)*		f p s t	H S		
	(H. decipiens Wats.)	»		f p s t	H S		
	H. corsicum Steud.	»	Corse	f p s	F		
	H. tetrapterum Fries	»	Eurasie	f p s t	F	f p s t +	73 71, 79
	(H. acutum Moench)	»		f p s t	F	f p s t +	73 77
	(H. neapolitanum Lam.)	»		f p s t	H S		
	H. quadrangulum L.	*Perforata (f)*	Europe	f p s t	F	f p s t	73
	(H. maculatum Crantz)	»		f p s t	F	f p s t +	73 71, 77
	(H. dubium Leers)	»		f p s t	F		
	H. desetangsi Lamotte	»	Europe	f p s t	F	+	71
Heterotaenium	*H. perforatum* L.	*Perforata (e)*	Cosmopolite	f p s t	F	f p s t +	60, 66, 73 71, 77, 79
	(H. veronense Schrank)	»		f p s t	H S		
	H. avicularіaefolium Jaub. et Spach	*Origanifolia*	Asie Mineure	f p s t	H S	f p s t	66
	(H. cymbiferum Boiss.)	»		f p s t	H S		
	H. leprosum Boiss.	»	Asie Mineure	f p s t	H S	f p s t	66

espèces velues	*H. origanifolium* Willd.	*Origanifolia*	Asie Mineure	f p s t	H S	f p s	66
	(*H. pulverulentum* Fenzl)	»		f p s t	H S		
	H. brachycalycinum Bornm.	»	Asie Mineure	f p s t	H P		
	H. byzantinum Aznavour	»	Asie Mineure	f p s t	H P		
	H. trichocaulon Boiss. et Heldr.	*Origanifolia*	Crète	f p s	F	f p s	66
	H. boissieri Petrovic		Balkans	f p s	H P		
	H. perfoliatum L.	*Drosocarpium (b)*	Méditerranée	f p s	H S	f p s	73
	(*H. ciliatum* Lam.)	»		f p s	H S	f p s	66
	(*H. dentatum* Loisel.)	»		f p s	H S		
	H. annulatum Moris	»	Sardaigne	f p s	H P		
Drosocarpium	*H. vesiculosum* Griseb.	*Drosocarpium (a)*	Grèce	f p s	H P		
	H. richeri Vill.	*Drosocarpium (c)*	Eurasie	f p s	F	f p s	73
	(*H. fimbriatum* Lam.)	»		f p s	H S		
	(*H. alpigenum* Kit.)	»		f p s	H S		
	H. balcanicum Velen.	»	Eur. orient.	f p s	H P		
	H. rochelii Griseb. et Schenk	*Drosocarpium (b)*	Eur. orient.	f p s	H P		
	H. umbellatum Kerner	»	Eur. orient.	f p s	H S		
	H. bithynicum Boiss.	»	Asie Mineure	f p s	H S		
	H. montbretii Spach	»	Asie Mineure	f p s	H S		
	H. rumelicum Boiss.	*Drosocarpium (d)*	Macédoine	f p s	F		
	H. barbatum Jacq.	*Drosocarpium (e)*	Eur. orient.	f p s	F	+	77
	H. sampsoni Hance		Chine	f p s	H S	+	78
CAMPYLOPUS	*H. rhodopeum* Friv.	*Campylopus*	Asie Mineure	f p s	F	f p s	73
MYRIANDRA							
Centrosperma	*H. fasciculatum* Lam.		Amér. bor.	-	H S		
	H. rosmarinifolium Lam.		»	-	H P		
	H. prolificum L.		»	-	F		
	(*H. foliosum* Jacq.)			-	H P		
	H. kalmianum L.		»	-	F	-	73

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
	H. lobocarpum Gatt.		»	-	H P	+	77
	H. densiflorum Pursh		»	-	F	-	73
						+	77
	H. frondosum Michx.		»	-	F		
	(H. aureum Bartr.)			-	H S	-	77
Suturosperma	*H. adpressum* Bart.		Amér. bor.	-	H S		
	H. myrtifolium Lam.		»	-	H S		
	H. nudiflorum Michx.		»	-	H S		
	H. galioides Lam.		»	-	H S		
	(H. axillare Lam.)					+	60
	(H. ambiguum Ell.)			-	H S		
BRATHYDIUM	*H. sphaerocarpum* Michx.		Amér. bor.	-	H S		
	H. dolabriforme Vent.		»	-	H S		
	H. ellipticum Hook.		»	-	H P		
	H. cistifolium Lam.		»	-	H S		
	H. buckleyi Curtis		»	-	H P		
BRATHYS							
Eubrathys	*H. gnidioides* Seeman		Mexique	-	H P		
	H. mexicanum L.		»	-	H P		
	H. laricifolium Juss.		Amér. austr.	-	H P		
	H. struthiolaefolium Juss.		»	-	H P		
	H. thujoides Kunth		»	-	H S		
	H. caracasanum Willd.		»	-	H P		
	H. silenoides Juss.		»	-	H P		
	H. hartwegi Benth.		»	-	H P		
	H. loxense Benth.		»	-	H P		
	H. quitense Keller		»	-	H P		
	H. jussiaei Planch.		»	-	H P		

Eubrathys (suite)	*H. rigidum* St Hil.		Amér. austr.	-	H P		
	H. chamaemyrtus Triana		»	-	H P		
	H. brathys Lam.		»	-	H S		
	(H. juniperinum Kunth)			-	H P		
	H. rufescens Klotzsch.		»	-	H P		
	H. pelletorianum St Hil.		»	-	H P		
	H. myrianthum Cham. et Schl.		»	-	H P		
Spachium	*H. japonicum* Thunb.		Asie orient.	-	H S		
	(H. pusillum Choisy)			-	H S		
	H. lalandii Choisy		Asie, Afr. trop.	-	H S	(+)	60
	(H. foetidum Hook.)			-	H S		
	H. afropalustre Lebrun		Congo belge	-	H P		
	H. gramineum Forst.		Australie	-	H P		
	H. angulosum Michx.		Amér. bor.	-	H S		
	(H. virgatum Lam.)			-	H P		
	H. setosum L.		»	-	H P		
	H. mutilum L.		»	-	H S		
	H. boreale Bickn.		»	-	H S		
	H. canadense L.		»	-	H S		
	H. gymnanthemum Engelm.		»	-	H P		
	H. sarothra Michx.		»	-	H S		
	(H. gentianoides Britt.)			-	H P	+	77
	H. anagalloides Cham. et Schl.		»	-	H P		
	H. brevistylum Choisy		»	-	H P		
	H. drummondii Torr. et Gray		»	-	H S		
	H. denticulatum Kunth		Mexique	-	H P		
	H. diffusum Rose		»	-	H P		
	H. submontanum Rose		»	-	H P		
	H. thesiifolium Kunth		»	-	H S		
	(H. uliginosum Kunth)			-	H S		
	H. fastigiatum Kunth		»	-	H S		
	H. paniculatum Kunth		»	-	H P		
	H. pratense Cham. et Schl.		»	-	H P		
	H. arenarioides Rich.		Amér. centrale	-	H P		

Section et sous-section KELLER	Nom de l'espèce	Section STEFANOFF	Origine géographique	Résultats personnels	Origine échant.	Résultats auteurs	Références
	H. diosmoides Griseb.		»	-	H P		
	H. connatum L.		Amér. australe	-	H P		
	H. parviflorum St Hil.		»	-	H P		
	H. caespitosum Cham. et Schl.		»	-	H P		
	H. chilense Gay		»	-	H S		
	H. campestre Cham. et Schl.		Brésil	-	H P		
	H. tenuifolium St Hil.		»	-	H P		
	H. linoides St Hil.		»	-	H P		
	H. laxiusculum St Hil.		»	-	H P		
Espèces à classement incertain	*H. kiboense* Oliv.		Afr. orient.	f p s	H P		
	H. nervosum Choisy		Java	-	H P		
	H. yunnanense Franch		Chine	f p s	H P		
	H. asahinae Makino		Japon			+	78
	H. fujisanense Makino		»			+	78
	H. gracillinum Koidz		»			+	78
	H. hachijoense Nakai		»			+	78
	H. kanae Koidz		»			+	78
	H. kinashianum Koidz		»			+	78
	H. nikkoense Makino		»			+	78
	H. ovalifolium Koidz		»			+	78
	H. penthorodes Koidz		»			+	78
	H. samaniense Miyabe		»			+	78
	H. senanense Maxim.		»			+	78
	H. shikokumontanum Makino		»			+	78
	H. umbrosum Kimura		»			+	78
	H. vulcanicum Koidz		»			+	78
	H. randaiense Hayata		Formose			+	78
	H. takentianum ?		?			+	78

PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes d'analyse de l'hypéricine (chapitre II)

Méthode de localisation à l'acide nitrique concentré.

On dispose les parties de plante à examiner sur un verre de montre et on recouvre de quelques gouttes d'acide nitrique concentré. S'il s'agit de pétales, un traitement à froid est suffisant. S'il s'agit de sépales, de feuilles ou de tiges, on chauffe au bain-marie jusqu'à apparition de vapeurs nitreuses. On rince rapidement à l'eau et on examine à la loupe binoculaire. On observe alors les glandes noires sur fond jaune clair.

Méthode d'empreinte chromatographique.

On dispose les organes de plantes à examiner sur un verre de montre et on les recouvre d'une solution de potasse alcoolique (90 ml alcool à 95° + 10 ml KOH 10 N); s'il s'agit d'un échantillon frais ou des pétales secs, on laisse en contact à froid; s'il s'agit d'un échantillon d'herbier, on chauffe au bain-marie bouillant. Lorsque l'échantillon examiné a pris une teinte noirâtre uniforme, on lave à l'eau. On traite alors à froid par l'acide acétique glacial jusqu'à éclaircissement, puis on lave à l'eau et on sèche brièvement les échantillons entre deux feuilles de papier filtre. Si la chlorophylle n'est pas entièrement éliminée, il faut répéter le traitement à la potasse alcoolique et à l'acide acétique. On dispose alors l'échantillon examiné sur une feuille de papier filtre épais (p.ex. papier chromatographique) et on applique au-dessus une deuxième feuille de papier filtre imprégnée de méthanol. On passe rapidement sur cette seconde feuille un fer à repasser chaud : l'hypéricine se dissout dans le méthanol et passe sur le papier filtre, sans diffuser trop largement. On obtient ainsi une empreinte de l'échantillon dont les figures 1, 2 et 3 montrent des exemples; les glandes à hypéricine donnent sur le papier des ponctuations rouges visibles directement, ou mieux par leur fluorescence rouge intense sous éclairage U.V. On peut compléter la caractérisation de l'hypéricine en traitant le papier par la potasse alcoolique : les ponctuations roses virent au vert; le virage de la

teinte peut se suivre très facilement à la loupe binoculaire ou sous la lampe U.V.

La technique d'empreinte, légèrement modifiée, permet également la caractérisation de l'hypéricine par son R_F en chromatographie sur papier. Après traitement par la potasse alcoolique et l'acide acétique, on presse l'échantillon à froid entre feuilles de papier chromatographique, imprégnées de méthanol. En quelques minutes, l'hypéricine diffuse sur le papier. En choisissant convenablement la forme de l'échantillon (fragment de feuille p.ex.), on peut obtenir une tache suffisamment peu étendue. On dispose parallèlement à la tache à analyser une goutte d'une solution d'hypéricine pure. On développe le chromatogramme par le solvant n-BuOH-AcOH-H_2O 4:1:5 et on observe les spots d'hypéricine soit directement soit par leur fluorescence rouge dans l'U.V. Dans le solvant préconisé par KUČERA, l'hypéricine a un R_F voisin de 0,9.

Méthode de dosage de l'hypéricine.

On épuise la plante sèche pulvérisée, par l'éther, jusqu'à élimination aussi complète que possible de la chlorophylle et autres substances gênantes; après séchage, on traite au méthanol qui dissout l'hypéricine. On introduit 3-4 ml de solution méthanolique à examiner dans la cuve d'un spectrophotomètre (Beckman DK 2, épaisseur e = 1 cm). Pour conclure à la présence d'hypéricine, on se base sur la présence de maximums d'absorption à 590, 548 et 508 mμ. La détermination quantitative de l'hypéricine se fait sur le maximum à 590 mμ en utilisant comme coefficient d'extinction $\varepsilon = 4{,}16 \times 10^4$.

TABLEAU 10

Résultats du dosage spectrophotométrique de l'hypéricine dans le genre Hypericum (dosages effectués sur les tiges feuillées, non fleuries).

Nom de l'espèce	mg hypéricine/kg plante sèche	Nom de l'espèce	mg hypéricine/kg plante sèche
H. perforatum L.	984 mg/kg	*H. rhodopeum* Friv.	53 mg/kg
H. tetrapterum Fries	432 mg/kg	*H. olympicum* L.	37 mg/kg
H. undulatum Schousb.	264 mg/kg	*H. trichocaulon* Boiss.	80 mg/kg
H. rumelicum Boiss.	420 mg/kg	*H. repens* L.	163 mg/kg
H. richeri Vill.	280 mg/kg	*H. atomarium* Boiss.	213 mg/kg
H. hyssopifolium Vill.	268 mg/kg	*H. lanuginosum* L.	275 mg/kg

Entraînement à la vapeur d'eau (chapitre III)

Appareil type CLEVENGER

On entraîne à la vapeur d'eau les parties aériennes ou les parties de plante étudiées, coupées en gros fragments, pendant 6 à 8 heures avec 5 fois leur poids d'eau environ ; l'essence est recueillie dans l'éther. Dans une ampoule à décantation, on procède au relargage de l'essence en saturant la phase aqueuse par du chlorure de sodium; puis on isole l'essence par des épuisements répétés à l'éther. Les solutions éthérées réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées dans un récipient taré jusqu'à poids constant.

Appareil de STAHL.

L'entraînement à la vapeur se fait comme précédemment, mais pendant 3 à 5 heures seulement (puisqu'on opère sur beaucoup moins de plante) et en recueillant l'essence dans le pentane. Lorsque la couche pentanique est bien séparée, on procède à la décantation minutieuse de l'essence à l'aide du robinet à trois voies, suivant la technique décrite par STAHL **(84)**. Comme le pentane et l'eau ne se mélangent pas, la solution pentanique de l'essence est pratiquement anhydre. On termine par évaporation du pentane dans un récipient taré jusqu'à poids constant.

Distillation fractionnée (chapitre III)

L'appareil à distillation fractionnée de Verre et Technique comprend :

1° Un ballon avec l'essence à distiller, surmonté d'une colonne à bande tournante et à température réglable.

2° Un timer réglant la fréquence et la grosseur des gouttes qui distillent.

3° Un récipient gradué où l'on recueille les fractions.

4° Pour la distillation sous vide, un système de robinets permettant de maintenir le vide dans l'appareil au moment des prélèvements.

Chromatographie sur colonne (chapitre III)

Préparation de la silice au nitrate d'argent (DE VRIES) :

On mélange au mortier 5 g de nitrate d'argent, en solution dans le minimum d'eau, avec 100 g de silice Merck. On active la

silice au nitrate d'argent pendant 1 heure à 120° et on la maintient à l'obscurité jusqu'au moment de l'emploi.

Pour la chromatographie, on évite le noircissement de l'adsorbant en enroulant un papier argenté autour de la colonne.

Chromatographie sur couche mince (chapitre III)

Nous avons toujours opéré sur silice G de Merck, avec des plaques de verre de 10 × 21 cm ; sur une plaque, on applique 2,5 g de silice G en suspension dans 10 ml d'eau et on active pendant 2 heures à 150°. Pour tous les problèmes de séparation des constituants des essences, les alumines neutre, acide et basique ont donné des résultats moins satisfaisants.

Le *développement* a été fait sur 16 cm environ dans différentes conditions ; les résultats que nous avons obtenus peuvent être schématisés comme le montre le tableau 11.

La *révélation* des terpènes a été faite à chaud soit par le chlorure d'antimoine en solution chloroformique (Cl_3Sb : 20 g ; $CHCl_3$: 100 ml), soit par l'aldéhyde anisique ou la vanilline en milieu sulfurique (aldéhyde : 0,5 g ; CH_3 - COOH glacial : 10 ml ; SO_4H_2 concentré : 5 ml ; méthanol : 85 ml **(93)**). Avec le chlorure d'antimoine, une coloration rouge virant lentement au vert sale, s'est avérée caractéristique des monoterpènes et de leurs dérivés oxygénés. Les réactifs aldéhydiques, quoique moins spécifiques, donnent des colorations plus variées, permettant souvent de distinguer des corps voisins. L'apparition d'une coloration bleue avec les vapeurs de brome ou les vapeurs nitreuses révèle la présence d'un sesquiterpène azulénogène.

Pour révéler les composés carbonylés, nous avons utilisé la dinitro - 2,4 - phénylhydrazine (2,4-DNPH : 1 g ; SO_4H_2 concentré : 2 g ; méthanol : 97 g). Pour tous les autres composés, nous avons révélé par SO_4H_2 concentré à froid, puis à chaud.

Chromatographie fonctionnelle sur couche mince (chapitre III)

Première technique : on dépose, au bas d'une chromatoplaque, une micro-goutte du produit à analyser et une ou plusieurs micro-gouttes de réactif spécifique ; pour améliorer le mélange des deux, on a intérêt à déposer une micro-goutte du réactif avant et une après le produit à analyser ; après quelques minutes de contact, on élue comme d'habitude et on révèle.

Technique du capillaire pour réactions lentes : on remplit, à la longueur désirée, un capillaire de la solution du produit à analyser et un autre de la solution du réactif. Par capillarité, on transfère l'un dans l'autre, puis on mélange par déplacement dans le tube. On laisse en contact le temps nécessaire pour que la réaction soit complète ; si la réaction se fait mieux à chaud, on scelle à la flamme les deux extrémités du capillaire. Au moment voulu, on porte le contenu du capillaire sur la chromatoplaque et on élue comme d'habitude.

TABLEAU 11

Schéma de la séparation des constituants des essences par chromatographie sur couche mince

1° Hydrocarbures.

a) Solvant : hexane à - 15°. Adsorbant : silice G de Merck.

Carbures saturés			R_F	>	0,90
Mono- et sesquiterpènes à 1 double liaison (ex. : pinènes, cédrènes)	0,85	>	R_F	>	0,65
Mono- et sesquiterpènes à 2 doubles liaisons (ex. : limonène, caryophyllène)	0,65	>	R_F	>	0,45
Mono- et sesquiterpènes à 3 doubles liaisons (ex. : myrcène, humulène)	0,45	>	R_F	>	0,25

Dans les couples d'isomères, l'isomère exo-méthylénique migre le plus lentement :

α - pinène	$R_F = 0,78$	α - cédrène :	$R_F = 0,72$
β - pinène	$R_F = 0,72$	β - cédrène :	$R_F = 0,67$

b) Solvant : hexane à température ordinaire. Adsorbant : silice G additionnée de 5 % de nitrate d'argent et activée 1 heure à 120°.

Carbures saturés			R_F	>	0,90
Mono- et sesquiterpènes à 1 double liaison (spots ronds en général)	0,85	>	R_F	>	0,30
Mono- et sesquiterpènes à 2 doubles liaisons (spots allongés en général)	0,30	>	R_F	>	0
Mono- et sesquiterpènes à 3 doubles liaisons			R_F	=	0

2° Composés oxygénés.

a) Solvant : hexane-acétate d'éthyle 9 : 1, à température ordinaire.

Hydrocarbures			R_F	>	0,90
Cinéoles, époxydes et esters terpéniques	0,80	>	R_F	>	0,60
Aldéhydes et cétones	0,60	>	R_F	>	0,40
Alcools	0,40	>	R_F	>	0,10
Acides			R_F	=	0

b) Solvant : hexane-acétate d'éthyle 8 : 2 ou hexane-méthanol 98 : 2 pour l'étude particulière des alcools.

TABLEAU 12 **Temps de rétention relatifs de composants des essences** **(Chapitre III)**

Substance	Point d'ébullition °C	Graisse de silicone 165° C	Carbowax 1500		NPGS 2 %		Craig 10 %	
			85° C	175° C	100° C	210° C	90° C	200° C
HYDROCARBURES SATURES								
n-heptane	98°	0,42	0,28		0,45		0,50	
n-octane	125°	0,57	0,37		0,56		0,58	
n-nonane	150°	0,79	0,50		0,75		0,73	
n-décane	174°	1,17	0,84		1,14		1	
n-undécane	197°	1,70	1,40		2,05	0,48	1,44	0,40
n-dodécane	216°			0,31	3,20	0,52	2,8	0,43
n-tridécane	234°			0,33		0,58		0,48
méthyl-2-octane	143°	0,70	0,40		0,68	0,42	0,67	
méthyl-2-décane	190°	1,50	1,30		1,92	0,47	1,40	
diméthyl-2-6-octane	158°	0,90	0,58		0,87		0,82	
MONOTERPENES (et composés voisins)								
myrcène	166°	1,08	2,15		1,60	0,50	1,67	0,42
allo-ocimène	188°		6		1,95		2,10	
limonène	177°	1,36	2,75		1,74	0,51	2	0,43
α -phellandrène	174°	1,27	2,10		1,68		1,74	
β -phellandrène	178°	1,41	2,70		1,90		1,98	
α -terpinène	180°		2,20		1,84		1,88	
α -pinène	155°	1	1	0,18	1	0,46	1	0,37
β -pinène	164°	1,19	1,67		1,32	0,49	1,40	0,40
camphène	160°	1,10	1,27		1,22		1,20	
Δ 3-carène	170°	1,35	1,95		1,60		1,58	
paracymène	177°		3,6	0,34	2,6	0,55	2,70	
cumène	152°		2,5	0,27	1,60	0,50	1,76	

SESQUITERPENES								
α -gurjunène	115° 10mm			0,79		0,87		0,68
α -cédrène	122° 12mm			0,92		0,98		0,93
β -cédrène				1,07		1,07		1,04
longifolène	126° 15mm			0,96		1,02		0,98
aromadendrène	122° 10mm			1,20		1,12		1,07
calarène	122° 13mm			1,04		1,02		0,94
caryophyllène	130° 14mm			1		1		1
humulène	133° 16mm			1,22		1,13		1,16
OXYDES								
cinéol 1-8	176°	1,48	3,20	0,32	2,20	0,54	2,40	0,56
ALDEHYDES								
Aldéhyde caprylique	168°		4	0,36	3,10	0,58		0,59
Aldéhyde nonylique	185°			0,48		0,68		0,68
Aldéhyde caprique	208°			0,66		0,80		0,77
Aldéhyde laurique	230°			1,35		1,08		1,12
Aldéhyde myristique	166° 24mm					1,67		1,85
Aldéhyde benzoïque	178°					0,74		0,90
Aldéhyde anisique	248°			4,40		1,86		2,90
Citral	228°			1,50		2		1,28
Citronnellal	206°			0,62		0,83		0,75
CETONES								
Méthylheptylcétone	195°			0,89		0,82		0,88
Méthylnonylcétone	229°			0,92		0,90		0,90
Méthylhepténone	174°			0,48	1,90	0,58		0,62
Menthone	210°					0,78		0,83
Carvone	230°					1,10		1,40
Nopinone	210°					0,84		1,10

Substance	Point d'ébullition °C	Graisse de silicone 165° C	Carbowax 1500		NPGS 2 %		Craig 10 %	
			85° C	175° C	100° C	210° C	90° C	200° C
ALCOOLS, ESTERS								
Alcool *n*-octylique	195°			0,75		0,72		0,75
Alcool *n*-décylique	233°			1,57		1		1,02
Alcool *n*-dodécylique	257°					1,54		1,60
3-nonanol	195°			0,58		0,68		0,70
2-undécanol	232°			1,35		1,08		1,02
Diméthyl-2,6-octanol	212°			1,06		0,85		0,88
Alcool benzylique	205°			2,40		1,12		1,66
Géraniol	230°			2,10		0,57		1,32
Nérol	225° 745mm			1,82		0,57		1,22
Citronnellol	222°			1,57		0,57		1,08
Linalol	200°			0,70		0,59		0,72
α -terpinéol	220°			1,32		0,95		1,12
Valérianate d'amyle	204°			0,35		0,60		0,58
Acétate d'octyle	210°			0,58		0,72		0,70
Acétate de benzyle	214°					0,88		1,24
Acétate de linalyle	220° décomp.			0,75		0,94		0,80
Acétate de citronellyle	172° 34mm			1,08		1,12		1
Formiate de géranyle	114° 15mm					0,90		1,07
Acétate de géranyle	244°			1,52		0,95		1,15
Propionate de géranyle						1,06		1,32
Butyrate de géranyle	152° 18mm					1,24		1,56

Explications concernant le tableau 12:

Les résultats donnés dans le tableau 12 concernent les composants identifiés dans les essences d'*Hypericum* ou des substances déjà décrites dans d'autres essences. Les constituants les plus volatils et les moins polaires ont été étudiés sur les colonnes à température peu élevée (100° ou moins), alors que les autres substances ont été examinées à température voisine de 200°. Sur la colonne de graisse de silicone où les substances les plus volatiles ont leur optimum à 165°, les autres composés sortiraient à des températures trop élevées.

Dans le tableau 12, nous donnons les temps de rétention relatifs par rapport à une substance de référence : l' α-pinène pour les composés les plus volatils, le caryophyllène pour les autres substances. Afin de pouvoir mieux interpréter les temps de rétention, nous indiquons également les points d'ébullition des substances. On voit que le succinate de néopentylglycol (NPGS) est peu polaire et se rapproche de la graisse de silicone, alors que le succinate de butanediol (Craig), plus polaire, est intéressant pour la séparation des sesquiterpènes et des alcools terpéniques en particulier.

Appareils utilisés :

1° Aerograph Hy-FI modèle A-600-B (tableau 12 : colonnes NPGS et Craig):
Détecteur à ionisation de flamme.
Gaz détecteur : hydrogène (20 ml/minute).
Gaz vecteur : azote (10 ml/minute).
Enregistreur avec intégrateur de surface des pics.
Colonne : longueur : 2,50 m ; diamètre : 3,15 mm..
Phases stationnaires :
- Succinate de néopentylglycol à 2 % (NPGS) sur Firebrick 60-80 mesh.
- Succinate de butanediol à 10 % (Craig) sur Chromosorb 60-80 mesh.

Prises d'essai : 0,1-0,2 µl pour les produits purs, 0,5-1 µl pour les essences.

2° Fractomètre 116 Perkin-Elmer (tableau 12 : colonnes silicone et carbowax):
Détecteur : catharomètre à fil chauffant.

Gaz vecteur : hydrogène (pression d'entrée = 1,5 kg/ cm^2).
Enregistreur sans intégrateur.
Colonne : longueur : 4 m ; diamètre : 5 mm.
Phases stationnaires :
- Graisse de silicone et polyéthylèneglycol (Carbowax 1500).
Prises d'essai : 1-2 µl pour les produits purs, 5-10 µl pour les essences.

3° Appareil à programmation de température modèle 720 (F et M Scientific Corporation).
(voir figure 6 ; non utilisé pour la mesure des temps de rétention).
Détecteur : catharomètre à fil chauffant ; température : 340°.
Gaz vecteur : hydrogène (60 ml/minute).
Enregistreur avec intégrateur de surface des pics.
Colonne : longueur : 2 m ; diamètre : 5 mm.
Phase stationnaire :
- Succinate de néopentylglycol 2 % sur Firebrick 60-80 mesh.

Chromatographie gazeuse de substances isolées sur chromatoplaques (chapitre III)

Au bas d'une chromatoplaque, on dépose le mélange à analyser sur toute la largeur et on élue normalement la plaque par un solvant approprié. On dispose la plaque à 50° pendant quelques minutes pour chasser le solvant. En protégeant le reste de la plaque, on révèle une bande longitudinale pour repérer l'emplacement des spots. Sur la partie non révélée, on détache l'adsorbant au niveau des spots intéressants et on l'introduit dans un tube de verre effilé servant de microcolonne chromatographique. On élue l'adsorbant par le pentane, s'il s'agit d'un carbure, par l'éther ou le chlorure de méthylène dans le cas de composés oxygénés ; en utilisant un solvant volatil, on diminue les pertes lors de son évaporation. Le résidu d'évaporation, constitué par une substance pure ou du moins fortement prédominante, est étudié avec deux phases stationnaires, sur un chromatographe très sensible (détection à ionisation de flamme). De cette façon, la méthode ne nécessite qu'un résidu d'évaporation très faible (quelques mg).

Identification des carbures saturés par bromation des essences.

10 à 20 mg d'essence, en solution dans le pentane, sont traités par une solution de brome à 10 % dans le pentane ; on arrête l'addition de brome, lorsque la solution reste colorée en jaune. On filtre la solution pentanique sur une microcolonne d'alumine (un tube

de verre effilé p.ex.) et on la concentre avec précaution, sans l'évaporer complètement pour éviter les pertes en carbures. Cette solution, étudiée en chromatographie gazeuse avec une sensibilité élevée, ne présente plus que les pics des carbures saturés. Sur colonne non-polaire, le temps de rétention est fonction du point d'ébullition du carbure saturé et permet donc son identification.

Chromatographie gazeuse directe sur les échantillons de plantes (chapitre III)

Comme les échantillons analysés renferment généralement des traces d'essence seulement, la méthode n'est applicable que sur un chromatographe très sensible, avec détecteur à ionisation de flamme. Nous avons opéré sur l'Aerograph Hy-FI avec une sensibilité dix fois plus grande que celle utilisée pour les essences isolées et cent fois plus élevée que la sensibilité maxima du Fractomètre.

Une dérivation permet de faire passer une partie du gaz vecteur (azote) par le dispositif comprenant une valve réglable et un four à pyrolyse. Si la valve est en position normale (voir figure 7), l'azote franchit la valve sans passer par le four ; si elle est en position d'injection, l'azote passe par le four et entraîne dans l'injecteur de l'Aerograph les principes volatils de la plante portée à température élevée. Nous avons opéré comme suit : à l'aide d'un transformateur réglable, on porte le four à pyrolyse à 240° (température vérifiée au thermocouple) ; on introduit l'échantillon dans la cupule du four, la valve étant fermée ; on maintient la plante à 240° pendant 1 minute environ ; au moment où on ouvre la valve, on met en route le déroulement du papier de l'enregistreur, on laisse la valve en position d'injection pendant 10 secondes environ ; après fermeture de la valve, on peut retirer la cupule du four.

N.B. Entre deux expériences, il est nécessaire de débarrasser le four des produits non entraînés en mettant la valve en position d'injection pendant au moins trente secondes. Il faut également nettoyer assez souvent, à l'aide d'un fil d'acier, les fins conduits entre le four et la valve (voir figure 7 : orifices de nettoyage).

Tableau 13. **Rendements en essence des différentes espèces d'Hypericum (chapitre IV).**

Essences obtenues sur des plantes sauvages ou horticoles.

p.a. = parties aériennes ; fe. = feuilles ; fl. = fleurs ; fr. = fruits.
C = CLEVENGER ; S = STAHL ; A = alambic.

N°	Nom de l'espèce	Parties de plante étudiées	Lieu de récolte	Date de récolte	Stade d'évolution de la plante	Quantité d'essence disponible	Rendement en essence	Méthode d'isolement
1	*H. androsaemum* L.	p.a.	Strasbourg (jardin botanique)	1.7.	Début fructification	1,85 g	0,9 ‰	C
2	»	fe.	» »	15.6.	Floraison	0,15 g	0,6 ‰	S
3	»	fl.	» »	19.6.	Floraison	0,11 g	1,4 ‰	S
4	»	fr.	» »	16.8.	Fructification	0,20 g	1,25 ‰	S
5	*H. calycinum* L.	fr.	Strasbourg (jardins)	10.7.	Début floraison	4,2 g	7,5 ‰	C
6	»	fr.	» »	27.9.	Fin fructification	65 g	12 ‰	C
7	»	fe.	» »	10.7.	Début floraison	2,40 g	1,2 ‰	C
8	»	fe.	» »	14.9.	Fin fructification	1,1 g	0,75 ‰	C
9	*H. elatum* Ait.	p.a.	Paris (jardin botanique)	1.10.	» »	0,17 g	1 ‰	S
10	*H. hircinum* L.	fe.	Strasbourg (jardin botanique)	17.8.	Fin floraison	1,2 g	2,2 ‰	C
11	»	fr.	» »	10.9.	Fin fructification	2,5 g	3,5 ‰	C
12	*H. hirsutum* L.	p.a.	Mulhouse (Forêt du Rhin)	20.7.	Fin floraison	12,8 g	1,4 ‰	C
13	*H. humifusum* L.	p.a.	Wissembourg (prairie)	24.8	Début fructification	0,64 g	1,15 ‰	C
14	*H. inodorum* Willd.	p.a.	Paris (jardin botanique)	1.10	Fin fructification	0,19 g	1,3 ‰	S
15	*H. montanum* L.	p.a.	Saverne (clairière plaine)	11.7.	Début floraison	0,38 g	0,6 ‰	C
16	»	p.a.	Colmar (clairière montagne)	26.8.	Début fructification	0,98 g	1 ‰	C

17	*H. moserianum* André	p.a.	Strasbourg (jardin)	10.8.	Début floraison	0,10 g	1 ‰	S
18	»	p.a.	» »	27.9.	Fructification	0,19 g	1 ‰	S
19	*H. olympicum* L.	p.a.	Strasbourg (jardin botanique)	14.6.	Début floraison	0,12 g	1 ‰	S
20	»	p.a.	» »	20.8.	Fructification	0,41 g	0,75 ‰	S
21	*H. patulum* Thunb.	p.a.	» »	11.8.	Début fructification	0,22 g	1,1 ‰	S
22	*H. patulum* Thunb. var. *henryi* Bean	p.a.	Strasbourg (jardins)	8.8.	Début floraison	0,13 g	1 ‰	S
23	»	p.a.	» »	1.10.	Fructification	0,16 g	0,8 ‰	S
24	»	fr.	» »	28.8.	Début fructification	2,5 g	1,4 ‰	C
25	*H. pulchrum* L.	p.a.	Saverne (clairière plaine)	11.7.	Floraison	2,15 g	1,15 ‰	C
26	*H. perforatum* L.	p.a.	Strasbourg-Colmar (prairie) (clairière)	Fin juin	Floraison	56 g	1,25 ‰	A
27	■	p.a.	Strasbourg (prairie)	20.6.	Avant floraison	0,21 g	0,6 ‰	S
28	*H. perforatum* L.	p.a.	Strasbourg (jardin botanique)	26.6.	Début floraison	0,17 g	1,2 ‰	S
29	»	p.a.	» »	3.8.	Fin floraison	0,37 g	1,1 ‰	S
30	»	p.a.	» »	26.8.	Début fructification	0,31 g	0,8 ‰	S
31	»	fe.	» »	18.8.	» »	0,10 g	1 ‰	S
32	»	fr.	» »	18.8.	» »	0,34 g	2,2 ‰	S
33	Type intermédiaire *perfor.-quadrang.*	p.a.	Saverne (prairie)	11.7.	Fin floraison	1,9 g	1,05 ‰	C
34	*H. quadrangulum* L.	p.a.	Strasbourg (forêt du Rhin)	15.8.	Début fructification	0,85 g	1,2 ‰	C
35	»	p.a.	Strasbourg (jardin botanique)	25.6.	Début floraison	0,22 g	1,4 ‰	S
36	»	p.a.	» »	7.8.	Début fructification	0,26 g	0,8 ‰	S
37	»	p.a.	Hautes Vosges	15.7.	Floraison	3,7 g	1,2 ‰	S
38	*H. tetrapterum* Fries	p.a.	Thann (clairière)	20.8.	Début fructification	1,35 g	1 ‰	C
39	»	p.a.	Strasbourg (forêt du Rhin)	15.8.	Fin floraison	0,19 g	1 ‰	C
40	*H. undulatum* Schousb.	p.a.	Strasbourg (jardin botanique)	7.8.	Début fructification	0,08 g	1,15 ‰	S

Essences obtenues sur des plantes cultivées à partir des graines
(toujours isolées sur les parties aériennes par la méthode de STAHL)

N°	Nom de l'espèce	Origine des graines	Date de récolte	Stade d'évolution de la plante	Quantité d'essence disponible	Rendement en essence
41	*H. ascyron* L.	Bruxelles	14.8.	2e année début fructification	800 mg	0,8 ‰
42	*H. atomarium* Boiss.	Graz	13.8.	» » »	36 mg	0,25 ‰
43	(»)	Bonn	24.8.	1re année (ni fleurs ni fruits)	22 mg	0,35 ‰
44	*H. barbatum* Jacq.	Fribourg	22.8.	2e année (ni fleurs ni fruits)	32 mg	0,5 ‰
45	*H. canariense* L.	Kew (Londres)	17.9.	1re année (ni fleurs ni fruits)	50 mg	1,1 ‰
46	(*H. chinense* L.)	»	24.9.	1re année (ni fleurs ni fruits)	20 mg	0,6 ‰
47	*H. coris* L.	Paris	26.8.	2e année début fructification	24 mg	0,8 ‰
48	*H. degenii* Bornm.	Strasbourg	14.8.	» » »	250 mg	0,6 ‰
49	*H. dubium* Leers	Cambridge	6.8.	1re année (ni fleurs ni fruits)	40 mg	0,9 ‰
50	*H. elegans* Steph.	Bonn	11.9.	1re année fructification	26 mg	0,45 ‰
51	*H. gebleri* Ledeb.	Riga	16.8.	2e année début fructification	210 mg	1 ‰
52	*H. hookerianum* Wight et Arn.	Fribourg	2.8.	2e année début floraison	80 mg	0,7 ‰
53	»	»	26.9.	2e année début fructification	90 mg	0,85 ‰
54	(*H. kalmianum* L.)	Paris	24.8.	2e année (ni fleurs ni fruits)	16 mg	0,5 ‰
55	*H. maculatum* Crantz	Gand	6.9.	1re année (ni fleurs ni fruits)	35 mg	0,7 ‰
56	*H. orientale* L.	Fribourg	13.8.	2e année début fructification	90 mg	0,85 ‰
57	*H. polyphyllum* Boiss.	Rostock	15.9.	1re année (ni fleurs ni fruits)	44 mg	0,45 ‰
58	*H. prolificum* L.	Fribourg	26.8.	2e année début fructification	30 mg	0,7 ‰
59	*H. rhodopeum* Friv.	Graz	23.8.	2e année (ni fleurs ni fruits)	25 mg	0,6 ‰
60	*H. rumelicum* Boiss.	Fribourg	20.8.	2e année (ni fleurs ni fruits)	30 mg	0,5 ‰
61	*H. tomentosum* L.	Genève	17.8.	1re année (ni fleurs ni fruits)	22 mg	0,5 ‰

N.B. Pour les espèces entre parenthèses, étudiées sans organes de reproduction, il subsiste un doute sur leur identité botanique avec des espèces voisines.

Isolement des huiles essentielles (chapitre IV).

Pour les espèces d'*Hypericum* disponibles en quantité notable (plus de 500 g de plante fraîche), nous avons effectué l'entraînement à la vapeur dans un appareil de CLEVENGER, pour les autres espèces, dans l'appareil de STAHL légèrement modifié selon la technique décrite au chapitre précédent.

Pour *H. perforatum* L., nous avons récolté 44 kg de parties aériennes en période de floraison (1er juillet) en Alsace et nous les avons soumises à l'entraînement à la vapeur d'eau pendant 8 heures, dans un alambic industriel * (3 et 4 juillet) ; l'essence a été récupérée dans des vases florentins par décantation, puis par épuisement des eaux au chlorure de méthylène. Cette essence (59 g) a été ensuite entraînée à nouveau à la vapeur au laboratoire, dans un appareil en verre, pour la purifier (56 g).

Distillation fractionnée des huiles essentielles (chapitre IV).

H. perforatum L. : nous avons distillé 52 g d'essence provenant des parties aériennes (voir tableau 13, référence n° 26) dans une microcolonne à bande tournante Verre et Technique : voir tableau 14.

TABLEAU 14

Fractions de l'essence d'H. perforatum L.

Eb	Pression mm	Poids recueilli	Composition
140° - 145°	760	12 g	méthyl-2-octane, *n*-nonane
146° - 149°	760	3 g	*n*-nonane, α-pinène
54° - 105°	15	13 g	pinènes, etc.
120° - 125°	5	3,5 g	sesquiterpènes surtout
125°	5	10 g	sesquiterpènes surtout
126° - 140°	5	2,5 g	sesquiterpènes surtout
140° - 200°	5	3 g	

(résidu nettement altéré par le chauffage)

H. hirsutum L. : 10 g d'essence provenant des parties aériennes (voir tableau 13, référence n° 12) ont été distillés dans un appareil à colonne Vigreux, sous vide (15mm Hg) et sous azote : voir tableau 15.

* Cette partie du travail a été effectuée aux usines Chiris, à Grasse.

TABLEAU 15

Fractions de l'essence d'H. hirsutum L.

Eb	Pression mm	Poids recueilli	Composition
38° - 40°	15	4,9 g	*n*-nonane surtout
60° - 74°	15	2,4 g	*n*-undécane surtout
Résidu		2,3 g	sesquiterpènes et aldéhydes saturés)

H. calycinum L. : nous avons effectué la distillation sur 58 g d'essence de fruits (voir tableau 13, référence n° 6) dans l'appareil à bande tournante, à la pression ordinaire : voir tableau 16.

TABLEAU 16

Fractions de l'essence d'H. calycinum L.

Eb	Poids recueilli	Composition
147° - 150°	14 g	*n*-nonane, α -pinène
150° - 156°	8 g	α -pinène pur
157° - 162°	10 g	pinènes
162° - 164°	11 g	β -pinène presque pur
164° - 175°	4,5 g	β -pinène, myrcène, limonène
Résidu	7 g	limonène, α -terpinéol surtout

Identification de constituants des huiles essentielles (chapitre IV).

Les spectres de R.M.N. ont été mesurés sur un appareil Varian A-60, en utilisant le tétrachlorure de carbone comme solvant. Les spectres infra-rouges ont été déterminés, en solution dans le chloroforme, à l'aide d'un spectrographe Beckman IR-5-A. Les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées en solution chloroformique, à l'aide d'un appareil Rudolph, avec arc au xénon comme source (t = 22° à 25°). Les R_F en chromatographie sur couche mince et les temps de rétention en chromatographie gazeuse que nous n'indiquons pas dans ce chapitre, figurent dans les tableaux 11 et 12 ci-dessus.

Méthyl-2-octane.

D'après le spectre infra-rouge, le constituant prédominant de la première fraction de l'essence d'*H. perforatum* L. est un carbure saturé. Nous avons soumis 3 g de cette fraction à une ozonolyse dans le chlorure de méthylène et la pyridine **(110)**. Après élimination de la pyridine par l'acide chlorhydrique et du chlorure de méthylène

par évaporation, nous avons soumis le résidu à une chromatographie sur silice G Merck avec élution à l'éther de pétrole: le premier éluat obtenu renfermait au moins 97 % de méthyl-2-octane (l'impureté étant le *n*-nonane).

Méthyl-2-décane.

Nous avons traité 20 mg d'essence d'*H. olympicum* L. par le brome suivant la méthode que nous préconisons pour la caractérisation des carbures saturés (voir chapitre III). Le résidu est comparé en chromatographie gazeuse, sur plusieurs phases stationnaires (voir tableau 12) avec le méthyl-2-décane que nous avons préparé par synthèse **(113)**.

n-Nonane et n-undécane.

Pour isoler le *n*-nonane, nous avons chromatographié sur silice G Merck la première fraction de l'essence d'*H. hirsutum* L. (4,9 g) : l'éluat à l'éther de pétrole, le plus riche en *n*-nonane, nous a servi pour les spectres I.R. et R.M.N.; il était encore souillé de 4 à 5 % de *n*-undécane.

Le même traitement, appliqué à la deuxième fraction de l'essence d'*H. hirsutum* L. (2,4 g), a fourni le *n*-undécane à 90 % de pureté, uniquement souillé par le *n*-nonane.

α- *et* β-*pinènes.*

D'après la chromatographie gazeuse, certaines fractions de l'essence d'*H. calycinum* L. sont constituées par des pinènes presque purs :

Fraction 2 (150°-156°) : 98 % α-pinène (impureté : β-pinène)
Fraction 4 (162°-164°) : 95-96 % β-pinène (impuretés : α-pinène, myrcène, limonène).

Nous avons effectué les mesures physiques directement sur ces fractions,

α-pinène : $[\alpha]_D = +45°$. β-pinène : $[\alpha]_D = -18°$.

Avec l'α-pinène pur et celui à caractériser, l'époxydation directe sur chromatoplaque par l'acide *p*-nitroperbenzoïque donne des spots de mêmes R_F (0,75) et de mêmes colorations (solvant : hexane - acétate d'éthyle 9 : 1 ; révélateurs : chlorure d'antimoine, aldéhyde anisique).

Pour caractériser le β-pinène, nous avons soumis 1 g de la quatrième fraction (essence *H. calycinum* L.) à l'ozonolyse dans le

mélange chlorure de méthylène-pyridine **(110)**. Après élimination de la pyridine par l'acide chlorhydrique, nous avons chromatographié sur alumine Merck et obtenu ainsi 600 mg de nopinone liquide. Cette cétone a été identifiée d'une part par son spectre infra-rouge, d'autre part par sa dinitro-2-4-phénylhydrazone : F = 142° et λ max = 348 mμ dans le spectre ultra-violet. Nous avons opéré par comparaison avec du β -pinène pur, traité dans les mêmes conditions.

Limonène.

Nous avons chromatographié sur colonne d'alumine Merck les 7 g résiduels de la distillation fractionnée de l'essence d'*H. calycinum* L.. Les éluats à l'éther de pétrole (3 g) présentent une forte odeur de citron, les temps de rétention du limonène en chromatographie gazeuse et les caractères du limonène sur chromatoplaques. Nous les avons purifiés par chromatographie sur une colonne de 60 g de silice G Merck contenant 5 % de nitrate d'argent ; on obtient ainsi du limonène à plus de 95 % de pureté, souillé encore par le myrcène surtout ; c'est ce produit qui nous a servi à faire le spectre infra-rouge et la mesure du pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = + 102°$.

L'époxydation sur chromatoplaque a été effectué dans les mêmes conditions que pour l' α -pinène (avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1, R_F de l'époxyde voisin de 0,65).

Myrcène.

Sur la dernière fraction de distillation de l'essence d'*H. calycinum* L., nous avons identifié le produit par comparaison avec le myrcène pur :

- En chromatographie sur couche mince, spot rose, puis verdâtre avec Cl_3Sb ; R_F = 0,35 avec l'hexane à - 15°.
- Le produit, extrait des chromatoplaques (éluées à l'hexane à - 15°, mais non révélées) par le pentane, présente en chromatographie gazeuse, sur deux phases stationnaires, les temps de rétention du myrcène (voir tableau 12).
- L'époxydation par l'acide *p*-nitroperbenzoïque sur chromatoplaque donne un spot d'époxyde qu'on observe également avec le myrcène : R_F = 0,60 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1.

Caryophyllène.

La fraction sesquiterpénique de l'essence d'*H. perforatum* L. (Eb_5 = 125°) renferme un peu de caryophyllène que nous avons mis en évidence de la façon suivante : nous avons enrichi 1 g de cette

fraction en caryophyllène (jusqu'à 40 % environ) par chromatographie sur 30 g de silice G Merck chargée de 5 % de nitrate d'argent. Nous avons comparé la fraction enrichie et le caryophyllène pur :

- Sur chromatoplaque, soit directement (R_F du caryophyllène : 0,50 avec l'hexane à - 15) soit après époxydation par l'acide *p*-nitroperbenzoïque (R_F des époxydes : 0,70 et 0,65 avec le solvant hexane-acétate d'éthyle 9 : 1).
- En chromatographie gazeuse, sur deux phases stationnaires (voir tableau 12), soit directement sur la fraction enrichie, soit après extraction du caryophyllène des chromatoplaques par le pentane.

Humulène.

Diverses essences d'*Hypericum* (voir tableau 18) présentent un spot de R_F = 0,35 avec l'hexane à - 15°, se révélant comme l'humulène avec Cl_3Sb (orangé) et l'aldéhyde anisique (rose); sur chromatoplaque au nitrate d'argent, le sesquiterpène ne migre qu'avec l'hexane additionné d'acétate d'éthyle.

L'époxydation de l'humulène sur chromatoplaque par l'acide *p*-nitroperbenzoïque fournit deux époxydes (R_F = 0,65 et 0,35 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1) qui sont donnés également par l'essence d'*H. quadrangulum* L., traitée d'une façon identique.

De chromatoplaques d'essence d'*H. quadrangulum* L., nous avons extrait l'humulène par le pentane et nous l'avons identifié par ses temps de rétention en chromatographie gazeuse, sur deux phases stationnaires (voir tableau 12).

α - *Terpinéol.*

Dans la chromatographie sur colonne d'alumine (voir limonène), les éluats à l'éther (2,5 g) sont récupérés et rechromatographiés sur 120 g de silice G Merck : on obtient ainsi une fraction (200 mg) constituée par de l'α -terpinéol presque pur (environ 98°). Nous l'avons identifié dans cette fraction, par comparaison avec le produit pur, par

- le spectre infra-rouge.
- la chromatographie gazeuse (voir tableau 12).
- la chromatographie sur couche mince : R_F de l'α -terpinéol : 0,30 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1.
- les modifications fonctionnelles en chromatographie sur couche mince :

  par déshydratation par l'acide sulfurique concentré, formation de monoterpènes, de R_F = 0,55 et 0,65 avec l'hexane à - 15°; avec

l'acide *p*-nitroperbenzoïque, formation d'époxydes, de R_F = 0,15 et 0,20 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1.

Géraniol.

Au cours de la chromatographie sur silice de l'α-terpinéol, nous avons recueilli des fractions contenant un deuxième alcool monoterpénique que nous avons identifié avec le géraniol d'après

- ses temps de rétention en chromatographie gazeuse (voir tableau 12).
- son comportement sur chromatoplaque : R_F = 0,25 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1 ; coloration rouge, puis verdâtre avec Cl_3Sb.
- ses propriétés fonctionnelles en chromatographie sur couche mince : l'anhydride chromique donne le citral, identifié par son R_F =0,50 (solvant : hexane-acétate d'éthyle 9 : 1) et sa révélation avec Cl_3Sb et la dinitrophénylhydrazine ; l'acétylation pyridinée conduit à un ester monoterpénique (R_F = 0,70 avec le même solvant).

n-octanal (aldéhyde caprylique).

En chromatographiant sur silice G Merck la deuxième fraction de l'essence d'*H. hirsutum* L. (voir *n*-undécane), on obtient un résidu de 150 mg à partir des éluats éthérés. Le composé prédominant de ce résidu est le *n*-octanal d'après

- ses temps de rétention en chromatographie gazeuse (voir tableau 12).
- son R_F (0,50 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1) et sa révélation (coloration jaune avec la dinitrophénylhydrazine) sur chromatoplaque.
- le R_F de sa dinitrophénylhydrazone sur chromatoplaque (0,40 avec le même mélange solvant).
- les temps de rétention (voir tableau 12) et le R_F sur chromatoplaque (0,35 avec le même mélange solvant) de l'alcool *n*-octylique, obtenu par réduction de l'aldéhyde avec le borohydrure de sodium.

n-décanal (aldéhyde caprique).

La chromatographie sur silice G Merck du résidu de la distillation de l'essence d'*H. hirsutum* L. (2,3 g) fournit 350 mg de résidu à partir des éluats éthérés. Sur ce résidu, on caractérise le *n*-décanal par les mêmes méthodes que le *n*-octanal :

- Sur chromatoplaque, R_F = 0,50 pour le *n*-décanal, R_F = 0,40 pour sa dinitrophénylhydrazone, R_F = 0,35 pour l'alcool *n*-décylique.
- En chromatographie gazeuse, par les temps de rétention du *n*-décanal et de l'alcool décylique (voir tableau 12).

Tableau 17. **Composition de la fraction volatile des essences d'Hypericum (chapitre V).**

Numéro de réference : renvoie au tableau 13.
EREMANTHE : section de la classification de KELLER.
Coridium : sous-section de la classification de KELLER.
p.a. : parties aériennes
MO : méthyl-2-octane
N : *n*-nonane
α-P : α-pinène
β-P : β-pinène
X ; substance à pic intermédiaire entre β-P et My sur colonne non polaire.
Traces : moins de 1 %
MD : méthyl-2-décane ?
U : *n*-undécane
My : myrcène
L : limonène
± : présence irrégulière
? : présence incertaine
Pour les espèces entre parenthèses, étudiées sans organes de reproduction, il subsiste un doute sur leur identité botanique avec des espèces voisines.

N°	Nom de l'espèce	Parties de plante étudiées	MO	N	α - P	β - P	My	L	(MD)	U	X
	EREMANTHE										
5-6	*H. calycinum* L.	fruits	-	3	45	38	3	10	-	1	
7-8	»	feuilles	-	6	20	45	5	24	-	traces	
17	*H. moserianum* André	p.a.	-	16	47	35	traces	1	-	1	
18	= *H. calycinum* L. × *H. patulum* Thunb.	p.a.	-	7	45	45	1	2	-	traces	

N°	Nom de l'espèce	Parties de plante étudiées	MO	N	α - P	β - P	My	L	(MD)	U	X
	NORYSCA										
21	*H. patulum* Thunb.	p.a.	-	65	4	3	?	25	-	3	
22	*H. patulum* Thunb. var. *henryi* Bean	p.a.	-	65	?	3	-	25	-	7	
23	»	p.a.	-	40	1	1	?	55	-	3	
24	»	fruits	-	35	14	20	6	18	-	7	
52	*H. hookerianum* Wight et Arn.	p.a.	?	50	5	8	?	15	-	22	
53	»	p.a.	-	32	8	22	10	16	-	12	
46	(*H. chinense* L.)	p.a.	-	6	30	27	-	22	-	15	
	ANDROSAEMUM										
1	*H. androsaemum* L.	p.a.	-	5	15	20	10	45	-	5	
2	»	feuilles	-	8	2	15	40	30	-	5	
3	»	fleurs	-	2	20	22	8	45	-	3	
4	»	fruits	-	traces	15	25	7	52	-	traces	
9	*H. elatum* Ait.	p.a.	-	3	20	42	4	30	-	traces	
10	*H. hircinum* L.	feuilles	-	60	2	?	6	6	-	30	
11	»	fruits	-	45	8	12	18	15	-	2	
14	*H. inodorum* Willd.	p.a.	-	50	5	10	traces	10	10	15	
	WEBBIA										
45	*H. canariense* L.	p.a.	?	5	1	3	8	82	-	traces	
	MYRIANDRA										
58	*H. prolificum* L.	p.a.	-	5	3	41	?	15	-	37	
54	*H. kalmianum* L.	p.a.	-	traces	1	40	-	11	-	48	

	ROSCYNA										
41	*H. ascyron* L.	p.a.	-	75	?	5	-	4	1	15	
51	*H. gebleri* Ledeb.	p.a.	-	80	?	8	-	-	?	10	2
	EUHYPERICUM										
	Coridium										
47	*H. coris* L.	p.a.	-	41	14	7	-	-	-	38	
	Olympia										
19	*H. olympicum* L.	p.a.	64	1	14	9	1	traces	4	7	
20	»	p.a.	58	1	8	15	2	2	5	9	
57	*H. polyphyllum* Boiss.	p.a.	27	2	6	44	3	?	4	14	
	Crossophyllum										
56	*H. orientale* L.	p.a.	-	1	43	2	-	3	-	51	
	Oligostema										
13	*H. humifusum* L.	p.a.	-	traces	75	8	7	3	-	7	
	Homotaenium										
15	*H. montanum* L.	p.a.	-	6	57	4	6	1	-	26	
16	»	p.a.	-	4	58	4	5	2	-	27	
25	*H. pulchrum* L.	p.a.	-	5	54	20	7	6	-	8	
50	*H. elegans* Steph.	p.a.	traces	10	10	16	1	traces	-	62	
12	*H. hirsutum* L.	p.a.	3	52	4	5	3	-	-	30	3
34	*H. quadrangulum* L.	p.a.	4	38	6	14	4	2	-	28	4
35	»	p.a.	4	68	2	10	1	-	-	14	1
36	»	p.a.	10	58	4	14	2	2	-	8	2
37	»	p.a.	3	52	10	11	4	-	1	9	10
49	*H. dubium* Leers	p.a.	3	60	2	8	1	3	-	18	5

N°	Nom de l'espèce	Parties de plante étudiées	MO	N	α - P	β - P	My	L	(MD)	U	X
55	*H. maculatum* Crantz	p.a.	4	40	6	3	1	5	-	36	5
38	*H. tetrapterum* Fries	p.a.	2	54	?	6	-	-	-	36	2
39	»	p.a.	3	64	?	5	-	-	-	24	4
40	*H. undulatum* Schousb.	p.a.	5	86	1	5	-	-	-	3	
42	*H. atomarium* Boiss.	p.a.	-	1	59	2	4	3	-	31	
43	(»)	p.a.	-	2	51	2	traces	2	-	43	
48	*H. degenii* Bornm.	p.a.	-	2	58	2	2	1	-	35	
61	*H. tomentosum* L.	p.a.	-	55	35	1	?	-	-	9	
	Heterotaenium										
33	*H. perf.* L. × *H. quadr.* L.	p.a.	18	32	12	8	2	4	4	20	
26	*H. perforatum* L.	p.a.	45	8	24	8	2	4	5	4	
27	»	p.a.	35	27	16	9	2	3	4	4	
28	»	p.a.	42	33	14	1	-	2	?	8	
29	»	p.a.	50	3	37	5	-	traces	2	3	
30	»	p.a.	48	2	35	10	-	traces	1	4	
31	»	feuilles	48	7	18	11	2	2	5	7	
32	»	fruits	30	3	52	12	1	1	traces	traces	
	Drosocarpium										
44	*H. barbatum* Jacq.	p.a.	-	2	42	2	?	?	-	54	
60	*H. rumelicum* Boiss.	p.a.	-	1	41	3	?	?	-	55	
	CAMPYLOPUS										
59	*H. rhodopeum* Friv.	p.a.	-	1	54	2	?	-	-	43	2

N.B. L'étude de la fraction volatile de l'essence de *Vismia guineensis* a montré que celle-ci était constituée presqu'uniquement par les pinènes et principalement l'α -pinène.

Tableau 18.

Composition de la fraction lourde des essences d'Hypericum (chapitre V).

Numéro de référence : renvoie au tableau 13.
- : absence ou présence de traces, non décelables avec certitude
+ : moins de 10 % de la fraction lourde
++ : 10 à 40 % de la fraction lourde
+++ : plus de 40 % de la fraction lourde
La présence des alcools monoterpéniques et des sesquiterpènes, suivis d'un point d'interrogation, est incomplètement démontrée.

O : *n*-octanal
D : *n*-décanal
G : géraniol
T : α-terpinéol
C : caryophyllène
H : humulène

N°	Nom de l'espèce	Alcools monoterpéniques	Aldéhydes saturés	Sesquiterpènes
5 - 6	*H. calycinum* L.	+++ (G,T)	+	-
17 - 18	*H. moserianum* André	++ (G,T)	+	-
21 - 24	*H. patulum* Thunb.	++ (G,T ?)	-	-
52 - 53	*H. hookerianum* Wight et Arn.	++ (G,T ?)	-	-
1 - 4	*H. androsaemum* L.	++ (G,T ?)	-	-
10 - 11	*H. hircinum* L.	++ (G,T)	+	-
9	*H. elatum* Ait.	+	-	+
14	*H. inodorum* Willd.	-	-	++
41	*H. ascyron* L.	+	-	++ (H)
51	*H. gebleri* Ledeb.	?	?	++ (H)
19 - 20	*H. olympicum* L.	-	-	+++ (H,C ?)
56	*H. orientale* L.	-	++	+ (H)
13	*H. humifusum* L.	-	+	+
15 - 16	*H. montanum* L.	-	++ (O,D)	++ (C ?)
25	*H. pulchrum* L.	-	++ (O,D)	++ (C ?)
48	*H. degenii* Bornm.	-	+	++
12	*H. hirsutum* L.	-	+++ (O,D)	++ (H,C ?)
40	*H. undulatum* Schousb.	-	++	+
38	*H. tetrapterum* Fries	-	+++ (O,D)	+
34 - 37	*H. quadrangulum* L.	-	++ (O,D)	++ (H,C ?)
33	*H. perforatum* L. × *H. quadrangulum* L.	-	+ (O,D)	+++ (H,C ?)
26 - 32	*H. perforatum* L.	traces	+ (O,D)	+++ (H,C)

Etude de l'extrait benzénique d'H. perforatum L. (chapitre VII)

Préparation de l'extrait benzénique.

Aux usines Chiris, à Grasse, nous avons récupéré et séché les parties aériennes d'*H. perforatum* L. (44 kg), provenant de l'entraînement à la vapeur d'eau (voir chapitre IV). La plante séchée a été soumise à deux macérations dans 250 litres de benzène, la première de 3 jours, la deuxième de quelques heures. La solution benzénique, concentrée à 10 litres environ à l'usine, a été évaporée à sec sous vide au laboratoire. Nous avons ainsi obtenu 1080 g d'extrait benzénique, fortement coloré par la chlorophylle et aussi par l'hypéricine retenue par l'extrait.

Extrait benzénique % : 1,080/44 = 2,45 %.

Saponification de l'extrait benzénique.

On chauffe à reflux, au bain-marie bouillant, pendant 6 heures 50 g d'extrait benzénique avec 300 ml de potasse alcoolique N/1. Après évaporation de l'alcool sous vide, il reste l'extrait saponifié avec une certaine quantité d'eau.

Préparation des fractions neutre et acide.

On sature l'eau par du chlorure de sodium et on dissout l'extrait saponifié par des épuisements répétés à l'éther jusqu'à ce que l'éther n'extrait plus rien ; les solutions éthérées réunies sont séchées sur SO_4Na_2 anhydre, puis évaporées à sec ; le résidu de 28,5 g constitue la *fraction neutre*.

Après neutralisation de la phase aqueuse par l'acide chlorhydrique en léger excès, on épuise à nouveau à l'éther jusqu'à extraction complète ; les solutions éthérées séchées et évaporées laissent un résidu d'environ 4 g constituant la *fraction acide*. Cette fraction, relativement peu abondante et surtout constituée par des acides gras banaux, n'a pas été étudiée.

Chromatographie sur colonne de la fraction neutre.

En traitant la fraction neutre (28,5 g) par l'éther de pétrole à l'ébullition, on obtient un résidu de 12 g et une partie soluble de 16,5 g ; d'après les chromatoplaques, ce traitement ne permet pas une séparation qualitative des constituants, mais il présente l'avantage d'éliminer de la partie soluble une grande partie des pigments et d'en faciliter ensuite la chromatographie sur colonne.

En chromatographiant 9,6 g de la partie soluble dans l'éther de pétrole bouillant sur 500 g d'alumine Merck, nous avons obtenu :

Eluant	*Résidu*
Ether de pétrole (E.P.)	800 mg
E.P. - benzène 1 : 1	700 mg
Benzène	100 mg
Benzène-éther 1 : 1	2 300 mg
Ether	3 200 mg

Isolement des carbures saturés (éluats à l'éther de pétrole).

Le résidu des éluats à l'éther de pétrole, à peine teinté de jaune, est recristallisé à plusieurs reprises dans le méthanol; on obtient ainsi des paillettes blanches. F = 63° - 64°.

- Analyse élémentaire :

Octacosane	$C_{28}H_{58}$ (394,74)	Calc. %	C	85,28	H	14,72
Triacontane	$C_{30}H_{62}$ (422,80)	Calc. %		85,31		14,69
		Trouvé		85,07		14,73
				85,51		14,80

- Chromatoplaque : spot unique sur le front du solvant, même avec l'hexane; révélation seulement par l'acide sulfurique concentré à 150°.

- Spectre infra-rouge (BrK) : bandes à 2.850, 1.460 et 1.370 cm^{-1}.

- Spectre de masse (effectué à Glasgow, laboratoire Pr. REED) : carbures de poids moléculaires 394 ($C_{28}H_{58}$) et 422 ($C_{30}H_{62}$).

Isolement des alcools saturés (éluats au mélange benzène-éther).

L'évaporation des éluats obtenus par le mélange benzène-éther laisse un résidu jaune que l'on soumet à des recristallisations répétées dans le benzène; on recueille un produit blanc, pulvérulent. F = 79°.

- Chromatoplaque : spot unique, de R_F = 0,35 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1, révélable par MnO_4K à froid et SO_4H_2 concentré à chaud.

- Analyse élémentaire :

$C_{24}H_{50}O$ (354,64)	Calc. %	C	81,36	H 14,12	O 4,52
$C_{26}H_{54}O$ (382,69)			81,675	14,135	4,19
$C_{28}H_{58}O$ (410,74)			81,95	14,15	3,90
	Trouvé		81,80	14,08	4,12
			81,67	14,17	4,16

- Spectre infra-rouge (BrK) : bandes ν(O-H) à 3.350 cm^{-1}, ν(C-O) à 1.060 cm^{-1}, bande faible $\nu(CH_3)$ à 1.370 cm^{-1}.

- Chromatographie gazeuse (effectuée à Glasgow, laboratoire Pr EGLINGTON) : 3 pics dont la surface permet le calcul approximatif de la composition quantitative :

  alcool saturé linéaire en C_{24}: 40 %
  » » » » C_{26}: 30 %
  » » » » C_{28}: 30 %

  Colonne : graisse de silicone à 0,25 % sur célite Chromosorb W ; longueur : 1,25 m ; température : 225°.
  Gaz vecteur : 50 ml/minute. Injection : 0,1 µl en sol. dioxannique.

- Dérivé acétylé : après acétylation pyridinée de 50 mg du mélange d'alcools, on extrait le dérivé acétylé à l'éther et on le recristallise dans le benzène. Le produit obtenu présente les caractéristiques suivantes : F = 63°. R_F sur chromatoplaque : 0,90 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1.

  Analyse élémentaire :

$C_{28} H_{56} O_2$ (424,72)	Calc. %	C 79,25	H 13,21	O 7,54
	Trouvé	78,85	13,05	8,10

Isolement du β -sitostérol (éluats à l'éther).

Le β -sitostérol est un constituant mineur des éluats éthérés, mais facile à suivre sur chromatoplaque grâce à sa révélation caractéristique par $SO_4 H_2$ concentré à froid.

Le résidu d'évaporation des éluats éthérés (3.200 mg) est d'abord rechromatographié sur de l'alumine Prolabo, désactivée par 10 % d'eau : les premiers éluats benzéniques (400 mg) sont évaporés à sec et redissous dans l'acétone chaude. Par cristallisation lente à froid, il se dépose des cristaux lamellaires (17 mg) qui se sont avérés constitués par du β -sitostérol pur ; en précipitant la solution acétonique par l'éther de pétrole, on obtient du β -sitostérol amorphe, moins pur. Le produit a été identifié par comparaison avec un échantillon de β -sitostérol pur :

- F = 139° (litt. **(136)** : environ 140°).

- Analyse élémentaire :

$C_{29} H_{50} O$ (414,69)	Calc. %	C 84,06	H 12,08	O 3,86
	Trouvé	83,96	12,23	3,81
		83,80	12,42	3,78

- Chromatoplaque : spot de R_F = 0,20 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1 ; coloration orangée, puis violacée avec SO_4H_2 concentré à froid.

- Spectre infra-rouge (BrK) : bandes ν(O-H) à 3.350 cm^{-1}, ν(C-O) à 1.060 cm^{-1}, ν(C-H) à 2.850, 1.460 et 1.370 cm^{-1}.

- Dérivé acétylé : on effectue l'acétylation pyridinée parallèlement sur le β -sitostérol témoin pur et sur du β -sitostérol encore impur, à caractériser : les dérivés acétylés donnent les mêmes spectres infra-rouges (bande ν(C=O) à 1.750 cm^{-1}) et les mêmes R_F sur chromatoplaque (R_F = 0,70 avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 9 : 1) ; le point de fusion du produit à caractériser, encore impur (F = 119°), est un peu inférieur à celui du dérivé acétylé pur (F = 126°).

BIBLIOGRAPHIE

1. H.G. SMITH, *J. Soc. Chem. Ind., 30* (1911), 1353.
2. H. ERDTMAN, *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., 2,* 1-28, Pergamon Press, London (1959).
3. H. ERDTMAN dans A. TODD, *Perspectives in Organic Chemistry,* p. 453-94, Interscience Publishers Inc., New York, London (1956).
4. R. HEGNAUER, *Planta Med., 7* (1959), 344-46.
5. R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen, 1* (1962), Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart.
6. R. PARIS et H. MOYSE, *Compt. rend., 245* (1957), 1265-68.
7. G.H.N. TOWERS et R.D. GIBBS, *Nature, 172* (1953), 25-26.
8. E.C. BATE-SMITH, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 27* (1956), 165-76.
9. N.T. MIROV, *Physiol. Forest Trees,* Symposium Harvard Forest, *1957,* 251-268.
10. V. PLOUVIER, *Rev. gén. sci. pures et appl., 69* (1962), 331-42.
11. J. BOUGAULT et L. BOURDIER, *J. pharm. chim., (6)29* (1909), 561-573.
12. T. KARIYONE et coll., *J. Pharm. Soc. Japan,* 79 (1959), 61-62 et 1340.
13. G. EGLINGTON, A.G. GONZALEZ, R.J. HAMILTON et R.A. RAPHAEL, *Phytochemistry, 1* (1962), 89-102.
14. D. GINSBURG, *The Opium Alkaloids,* p. 89, Interscience Publishers, New York, London (1962).
15. J. STREITH, Thèse Doct., Fac. Sciences, Strasbourg (1963); M. PALMADE, P. PESNELLE, J. STREITH, J. THEOBALD: travaux non publiés.
16. G. WEILL, *Recherches histologiques sur la famille des Hypéricacées,* Thèse Doct. Pharm., Paris (1903).

17. A. ENGLER et K. PRANTL, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 21,* 154-237, Engelmann, Leipzig, 2e édition (1925).

18. R. WETTSTEIN, *Handbuch der Systematischen Botanik,* 750-51, F. Deuticke, Leipzig-Wien, 4e édition (1935).

19. A.B. RENDLE, *The Classification of Flowering Plants,* 2 239-43, University Press, Cambridge (1959).

20. M. CHADEFAUD et L. EMBERGER, *Traité de Botanique Systématique, 2,* 1204-10, Ed. Masson, Paris (1960).

21. J. HUTCHINSON, *The Families of Flowering Plants, 1,* 297-300, Oxford University Press, London, 2e édition (1959).

22. A. TAKHTAJAN, *Die Evolution der Angiospermen,* 201, Gustav Fischer Verlag, Jena (1959).

23. A. AUBREVILLE, *La Flore Forestière de la Côte d'Ivoire, 2,* 325-40, Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, 2e édition (1959).

24. B. STEFANOFF, *Jahrbuch Land- und Forstwiss. Fakult. Univ. Sofia, 10* (1932), 19-57, *11* (1933), 139-86 et *12* (1934), 69-100.

25. N.K.B. ROBSON, British Museum (Natural History), London : travaux non publiés.

26. P. VAN TIEGHEM, *Bull. soc. bot. France, 31* (1884), 141-151 et *Ann. Sci. Natur.,* Botanique, 7e série, *1* (1885), 47-55.

27. Z. BRUNARSKA, *Acta Biol. Cracoviensia,* série Botanique, *1* (1958), 69-78 et *Dissertationes Pharm., 11* (1959), 75-96.

27 bis. A. BROUTIN, Thèse Doct. Pharm., Lille (1963).

28. G. ROUY, *Flore de France, 3,* 328-50, Soc. Sciences Naturelles, Charente-Inférieure (1896).

29. G. HEGI, *Illustrierte Flora von Mitteleuropa, 5,* 1re partie, 498-534, J.F. Lehmanns Verlag, München.

30. J.P. WILHELM, *Etude de quelques représentants du genre Hypericum,* Diplôme d'Etudes Supérieures, Fac. Sciences, Strasbourg (1960).

31. E. BOISSIER, *Flora Orientalis, 1,* 783-816 et suppl., 125-130, Genève (1867) et *Diagnoses Plantarum Orientalium,* 3 tomes, Genève (1842).

32. E. DE HALACSY, *Conspectus Florae Graecae, 1,* 274-285 (1900).

33. J.D. HOOKER, *Flora of British India, 1,* 252-57, Reeve, London (1875).

34. C.J. MAXIMOWICZ, *Diagnoses plantarum novarum asiaticarum*, 157-73, (1876-83).

35. D. OLIVER, *Flora of Tropical Africa, 1*, 154-162, Reeve, London (1868).

36. H. HUMBERT, *Flore de Madagascar et des Comores, 135-36.*

37. A. GRAY, *Manual of Botany*, p. 1007-15, American Book Company, 8e édition (1950).

38. N. BRITTON et A. BROWN, *Illustrated Flora of the Northern United States, Canada, ..., 2*, 527-537, New York Botanical Garden, 2e édition (1947).

39. L. ABRAMS, *Illustrated Flora of the Pacific States, 3*, 115-18, Stanford University Press, California (1955).

40. A. REHDER, *Manual of cultivated trees and shrubs*, p. 636-42, The Macmillan Company, New York, 2e édition (1947).

41. L.H. BAILEY, *The Standard Cyclopedia of Horticulture, 2*, 1629-33, The Macmillan Company, New York (1947).

42. C.K. SCHNEIDER, *Illustriertes Handbuch der Laubholzkunde, 2*, 331-39, Gustav Fischer Verlag, Jena (1912).

43. L. DIPPEL, *Handbuch der Laubholzkunde, 3*, 33-51, Verlag Paul Parey, Berlin (1893).

44. H. BROCKMANN, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 14* (1957), 141-85, Springer Verlag, Wien.

45. O. PLANCHE, *Ann. pharm. franç., 6* (1948), 546-65.

46. G.H. STOUT, R.A. ALDEN, J. KRAUT et D.F. HIGH, *J. Am. Chem. Soc., 84* (1962), 2653-54.

47. G.H. STOUT, V.F. STOUT et M.J. WELSH, *Tetrahedron Letters*, 1962, n° 13, 541-44 et *Tetrahedron, 19* (1963), 667-76.

48. P. YATES et G.H. STOUT, *Chem. and Ind.*, 1956, 1392-93 et *J. Am. Chem. Soc., 80* (1958), 1691-1700.

49. M. AMOROSA et L. LIPPARINI, *Ann. chim. (Rome), 45* (1955), 40-49 et 977-82; Chem. Abstr., *50* (1956), 369 h et 12080 b.

50. H. AUTERHOFF et coll., *Angew. Chemie, 74* (1962), 587.

51. K.V. NAGESWARA RAO et P.L. NARASIMHA RAO, *Experientia, 17* (1961), 213-14.

52. N.V. BRINGI et coll., *J. Sci. Ind. Res., 14 (B)* (1955), 135-52; B. DAYAL et S.C. MATHUR, *J. Sci. Res. Banaras Hindu Univ., 10* (1959-60), 1-5; D.V. KRISHNA MURTHY et P.L. NARASIMHA RAO, *Experientia, 17* (1961), 445-46.

53. G. KARTHA et coll., *Tetrahedron Letters,* 1963, n° 7, 459-72.

54. F.E. KING, T.J. KING et L.C. MANNING, *J. Chem. Soc.,* 1953, 3932-37 et 1957, 563-66.

55. J. POLONSKY, *Bull. soc. chim. France,* 1957, 1079-87 et 1958, 929-44.

56. R.A. FINNEGAN et C. DJERASSI, *Tetrahedron Letters,* 1959, n° 1, 10-14 et n° 13, 11-15; R.A. FINNEGAN, M.P. MORRIS et C. DJERASSI, *J. Org. Chem., 26* (1961), 1180-84.

57. V.S. GUPTA, P.L. NARASIMHA RAO et coll., *Chem. and Ind.,* 1962, 1469-70.

58. W.D. OLLIS, *Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds,* Pergamon Press, Oxford, New York, Paris (1961).

59. T.R. SESHADRI et S. NEELAKANTAN, *Current Sci., 30* (1961), 90-94.

60. R. SALGUES, *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, 8,* (1961), 38-64.

61. R. SALGUES, *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, 8,* (1961), 367-95.

62. C. CERNY, *Z. phys. Chem., 73* (1911), 371-82.

63. K. DIETERICH, *Pharm. Zentralhalle, 32* (1891), 683-85.

64. Z.M. IOANNIDES, *Compt. rend. soc. biol., 105* (1930), 349-51; *Arch. Inst. Pasteur Hellénique, 2* (1928), 161-65.

65. B. WOLFF, *Pharm. Zentralhalle, 36* (1895), 193-94.

66. E. SIERSCH, *Planta, 3* (1927), 481-89.

67. H. BROCKMANN, M.N. HASCHAD, K. MAIER et F. POHL, *Naturwissenschaften, 27* (1939), 550.

68. N. PACE et G. MACKINNEY, *J. Am. Chem. Soc., 61* (1939), 3594-95.

69. M. KUČERA, *Ceskoslav. farm., 7* (1958), 381-83; *Chem. Abstr., 53* (1959), 7.507e.

70. H. BROCKMANN, M.N. HASCHAD, K. MAIER et F. POHL, *Ann. Chem. Liebigs, 553* (1942), 1-52.

71. A. VAN DER KUY et R. HEGNAUER, *Pharm. Weekblad, 87* (1952), 179-82.

72. F. NEUWALD et U. HAGENSTRÖM, *Arch Pharm., 288* (1955), 38-42.

73. L. ROTH, *Deut. Apotheker-Ztg., 36* (1953), 653-56.

74. G. SCHEIBE et A. SCHÖNTAG, *Ber. deut. chem. Ges., 75* (1942), 2019-26.

75. P. HAGEDORN et R. NEU, *Arch. Pharm., 287* (1954), 70-74.

76. M.G. CHAPLINSKAYA, *Trudy L'vov Med. Inst., 12* (1957), 51-54; Chem. Abstr., *52* (1958), 2182 d.

77. H. BROCKMANN et W. SANNE, *Chem. Ber., 90* (1957), 2480-91.

78. T. KARIYONE et N. KAWANO, *J. Pharm. Soc. Japan, 73* (1953), 204-05.

79. M. GRIMS, *Acta Pharm. Jugosl., 9* (1959), 59-70.

80. M. NIELSEN, *Hereditas, 5* (1924), 378-82.

81. M.M. CHATTAWAY, *Brit. J. Exptl. Biol., 3* (1926), 141-43 ; *Botan. Centr., 7* (1926), 261.

82. C.S. HOAR et J. HAERTEL, *Botan. Gaz.,93* (1932), 197-204.

83. K. PAECH et M.V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 3,* 8, Springer Verlag, Berlin (1955).

84. E. STAHL, *Mikrochim. Acta, 40* (1953), 367-72.

85. L. ROTH, *Äther; Öle, Riechstoffe, Parfümer. Essenzen und Aromen, 2* (1952), 137-39.

86. H. BROCKMANN et H. MUXFELDT, *Chem. Ber., 89* (1956), 1393.

87. B. de VRIES, *Chem. and Ind., 24* (1962), 1049-50.

88. R. CONSDEN, A.H. GORDON et A.J.P. MARTIN, *Biochem. J., 38* (1944), 224-32.

89. R. PARIS et M. GODON, *Ann. pharm. franç., 19* (1961), 86-93.

90. J.G. KIRCHNER, J.M. MILLER et G.J. KELLER, *Anal. Chem., 23* (1951), 420-25.

91. R.H. REITSEMA, *Anal. Chem., 26* (1954), 960-63.

92. E. DEMOLE, *Chromatographic Reviews, 1* (1959), 1-10, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

93. E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie,* Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

94. K. RANDERATH, *Dünnschicht-Chromatographie,* Verlag Chemie, Weinheim (1962).

95. C.B. BARRETT, M.S.J. DALLAS et F.B. PADLEY, *Chem. and Ind., 24* (1962), 1050-51.

96. J.M. MILLER et J.G. KIRCHNER, *Anal. Chem., 1953,* 1107-09.

97. M. VILKAS, *Bull. soc. chim. France,* 1959, 1401-06.

98. J. GREEN et S. MARCINKIEWICZ, *J. Chromatog., 10* (1963), 35-41.

99. A.J.P. MARTIN et R.L.M. SYNGE, *Biochem. J., 35* (1941), 1358-68.

100. E. CREMER, R. MULLER et F. PRIOR, *Z. Elektrochem., 55* (1951), 66-70 et 217-20.

101. A.T. JAMES et A.J.P. MARTIN, *Biochem. J., 50* (1952), 679-90.

102. H.P. BURCHFIELD et E.E. STORRS, *Biochemical Applications of Gas Chromatography,* Academic Press, New York, London (1962).

103. A. LIBERTI et G.P. CARTONI, *Ricerca sci., 28* (1958), 1192-98. G.P. CARTONI et A. LIBERTI, *J. Chromatog., 3* (1960), 121-24.

104. W.J. ZUBYK et A.Z. CONNER, *Anal. Chem., 32* (1960), 912-17.

105. M.H. KLOUWEN et R. ter HEIDE, *J. Chromatog., 7* (1962), 297-310.

106. H. HAENSEL, *Deut. Apotheker-Ztg., 20* (1905), 45-46.

107. J. ZELLNER et Z. PORODKO, *Arch. Pharm., 263* (1925), 170-79.

108. R. MILLER, *J. Am. Pharm. Assoc., 16* (1927), 824-28.

109. T. BOGERT et S.J. MARION, *J. Am. Chem. Soc., 55* (1933), 4187-94.

110. J.M. CONIA et P. LERIVEREND, *Compt. rend., 250* (1960), 1078-80.

111. J.D. WHITE et A.R. GLASGOW, *J. Research Natl. Bur. Standards, 19* (1937), 423-35.

112. Cartothèque DMS, N° 2593, Verlag Chemie, Weinheim et Butterworths Scientific Publications, London.

113. E. TERRES et coll., *Brennstoff-Chem., 40* (1959), 279-80.

114. F. KRAFFT, *Ber. deut. chem. Ges., 15* (1882), 1687-1711.

115. J.A. POPLE, W.G. SCHNEIDER et H.J. BERNSTEIN, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, p. 234, Mc Graw-Hill Book Company Inc., New York (1959).

116. F.H. THURBER et R.C. THIELKE, *J. Am. Chem. Soc., 53* (1931), 1030-32.

117. J. PLIVA et V. HEROUT, *Collect. trav. chim. tchécoslov., 15* (1950), 160-74.

118. W. HUCKEL, *J. prakt. Chem., 157* (1941), 225-37.

119. W. HUCKEL, *Chem. Ber., 80* (1947), 39-41.

120. L. RUZICKA dans A. TODD, *Perspectives in Organic Chemistry*, 265-314, Interscience Publishers Inc., New York, London (1956).

121. P. CRABBE et G. OURISSON, *Ind. chim. belge, 22* (1957), 1309-20 et 1418-42.

122. F. SIGMUND, *Monatsh. Chem., 52* (1929), 190-91.

123. W. SANDERMANN et W. SCHWEERS, *Chem. Ber., 93* (1960), 2266-71.

124. K. MOTHES; F.H.L. VAN OS; R. HEGNAUER; etc.; *Pharm. Weekblad, 92* (1957), 817-70.

125. G. DILLEMANN, *Ann. pharm. franç., 17* (1959), 214-22.
Planta Med., 8 (1960), 263-74.
Bull. soc. bot. France, 108 (1961), Mémoires, 30-38.

126. W. HERBST, *Flora, 129* (1935), 235-59.

127. K.L. NOACK, *Z. Botan., 28* (1934), 1-71.

128. P. O'NEILL et A.G. PERKIN, *J. Chem. Soc., 113* (1918), 140.

129. Z. JERZMANOWSKA, *Wiadomosci farm., 64* (1937), 527-32.

130. A. MICHALUK, Z. BRUNARSKA et D. BEDNARSKA, *Dissertationes Pharm., 8* (1956), 47-62; *Chem. Abstr., 51* (1957), 10.679 f.

131. M. GRIMS, *Acta Pharm. Jugosl., 9* (1959), 113-26.

132. M.G. CHAPLINSKAYA, *Referat. Zhur. Khim., Biol. Khim.*, 1957, Abstr. n° 17.825; *Chem. Abstr., 52* (1958), 2.182 d.

133. V. GRIGNARD, *Traité de Chimie organique, 3*, 32, Ed. Masson et Cie, Paris (1935).

134. S.H. PIPER, A.C. CHIBNALL, ..., *Biochem. J.*, *25* (1931), 2072-94.

135. S.H. PIPER, A.C. CHIBNALL et E.F. WILLIAMS, *Biochem. J.*, *28* (1934), 2175-88.

136. L.J. SWIFT, *J. Am. Chem. Soc.*, *74* (1952), 1099-1100.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I.- Particularités botaniques du genre *Hypericum* et identification des espèces 10

CHAPITRE II.- Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* par l'hypéricine. Comparaison des matières colorantes des Hypéricacées et des Clusiacées 15
(figures 1 à 3, tableaux 1 à 4)

CHAPITRE III.- Méthodes d'étude des huiles essentielles 33
(figures 4 à 8)

CHAPITRE IV.- Identification de constituants des huiles essentielles d'*Hypericum* 48
(figures 9 et 10, tableaux 5 et 6)

CHAPITRE V.- Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* au moyen des huiles essentielles (tableau 7) 61

CHAPITRE VI.- Hybridation et composition des essences d'*Hypericum* 69

CHAPITRE VII.- Etude de l'extrait benzénique d'*Hypericum perforatum* L. (tableau 8) 72

CONCLUSIONS GENERALES 76

PARTIE EXPERIMENTALE concernant
le chapitre II (tableaux 9 et 10) 78
le chapitre III (tableaux 11 et 12) 91
le chapitre IV (tableaux 13 à 16) 100
le chapitre V (tableaux 17 et 18) 109
le chapitre VII 114

BIBLIOGRAPHIE 119

Imprimé à la COOPE de l'A.F.G.E.S.